

CHARLIE BASSET

**PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS
PROVENIENTES DE MADEIRAS DURÁVEIS DA AMAZÔNIA**

Cayenne - Guyane Française

2011

CO-TUTELA INTERNACIONAL DE TESE DE DOUTORADO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

e

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

FACULTÉ DE SCIENCES, TECHNOLOGIES ET SANTÉ

École doctorale Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques

Spécialité Chimie des Substances Naturelles

CHARLIE BASSET

**PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS
PROVENIENTES DE MADEIRAS DURÁVEIS DA AMAZÔNIA**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Laila Salmen Espindola - Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Didier Stien - Université des Antilles et de la Guyane

Cayenne - Guyane Française

2011

CHARLIE BASSET

**PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS
PROVENIENTES DE MADEIRAS DURÁVEIS DA AMAZÔNIA**

Relatório apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas para obtenção do grau de Doutor em co-tutela entre a Universidade de Brasília, sob a orientação da Prof^a Dr^a Laila Salmen Espindola e a Universidade das Antilhas e da Guiana, sob a orientação do Prof. Dr. Didier Stien.

Cayenne - Guyane Française

Novembro 2011

« Liberdade é o espaço que a felicidade precisa. »

Fernando Pessoa

**« La beauté naît du regard de
l'homme. Mais le regard de l'homme naît
de la nature. »**

Hubert Reeves

Remerciements

En premier lieu, je remercie Georges Massiot et Vanderlan Da Silva Bolzani pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour avoir participé au jury. Je remercie également Christophe Duplais pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie les collègues de l'Université des Antilles et de la Guyane, de l'UMR Ecofog et du L3MA, pour leurs conseils et l'ambiance, les compagnons de manipulations, de récoltes et autres activités en dehors du laboratoire... en pensant particulièrement à Alice RODRIGUES, Florent ROBERT, Pierre-Alain BLANDINIÈRES, Nadine AMUSANT, Xavier CUNIBERTI, Mounim LEBRINI, Christophe ROOS, Guillaume ODONNE, Damien BOURREAU, Jean-Michel MARTIN, Charlotte NIRMA, Raphaëlle RINALDO et Julie Anne MILLER.

A Brasília, mes remerciements vont à toute l'équipe et les étudiants du Laboratoire de Pharmacognosie de l'UnB, ainsi que les collègues de l'Université, pour leur accueil chaleureux, leur sympathie et leur écoute : Gabriela pour nous avoir hébergé dans son laboratoire, Phellipe THEODORO, Mariana LAUNDRY DE MESQUITA, Everton MACEDO SILVA, Camila MIRANDA et Polyana ARAUJO entre autres. Et surtout Thiago MEIRELLES CASELLA, compagnon de thèse assidu.

Je tiens à remercier Norberto P. LOPES « Betão », de la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Ribeirão Preto – SP, ainsi que ses élèves à l'hospitalité formidable, pour son aide précieuse en chimie lors de ce projet et pour sa convivialité communicative.

Je tiens à remercier Jacques BEAUCHÊNE, de l'UMR Ecofog, pour ses bons conseils sur le choix des arbres et le partage de sa riche connaissance dans ce domaine.

Je remercie Véronique EPARVIER, de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, pour son aide lors des récoltes de pou d'agoutis, ses conseils en chimie, sa patience et le partage de ses connaissances scientifiques.

Je souhaite remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Didier STIEN et Laila S. ESPINDOLA, qui ont su m'orienter tout au long de ce travail, m'accordant leurs conseils, leur soutien et leur aide précieuse lors de cette expérience professionnelle des plus enrichissantes.

Mes amis en France, en Guyane et au Brésil, mais surtout ma famille, sans qui ce document n'aurait jamais vu le jour, je les remercie pour leur écoute et les bons moments vécus. Je remercie tout particulièrement mes parents à qui je dédie ce travail, pour leur amour et soutien, pour avoir partagé mes doutes et su m'épauler dans les durs moments. Enfin, à Claire, qui a toujours cru en moi, su me comprendre et me supporter durant ces 3 ans de périple.

Tome 1 : Thèse (en français).....5

Tome 2 : Résumé détaillé (en portugais).....221

Volume 1 : Tese (em francês).....5

Volume 2 : Resumo detalhado (em português).....221

Table des matières

Introduction	17
PARTIE 1. Contexte de l'étude	19
1.1 Généralités	19
1.1.1 Caractéristiques générales des champignons.....	19
1.1.1.1 La cellule fongique.....	19
1.1.1.2 Mode de nutrition	21
1.1.2 Les infections fongiques humaines	21
1.1.3 Traitement des infections fongiques	23
1.1.3.1 Historique.....	23
1.1.3.2 Les traitements actuels.....	24
1.1.3.2.1 Les molécules antifongiques d'origine naturelle.....	26
1.1.3.2.1.1 Les macrolides polyéniques	26
1.1.3.2.1.2 Les benzofuranes	26
1.1.3.2.1.3 Les nikkomycines	26
1.1.3.2.1.4 La sordarine	27
1.1.3.2.2 Les molécules antifongiques semi-synthétiques.....	27
1.1.3.2.2.1 Les équinoïdines.....	27
1.1.3.2.3 Les molécules antifongiques d'origine synthétique.....	28
1.1.3.2.3.1 Les allylamine.....	28
1.1.3.2.3.2 Les azoles.....	29
1.1.3.2.3.3 Les pyrimidines	30
1.1.4 Les produits naturels antifongiques	31
1.1.4.1 Place des produits naturels dans la recherche pharmaceutique industrielle	31
1.1.4.2 Situation actuelle de la recherche de produits naturels antifongiques.....	32
1.1.4.3 Substances naturelles antifongiques d'origine végétale.....	34
1.1.4.3.1 Terpènes et terpénoïdes	34
1.1.4.3.2 Saponines.....	35
1.1.4.3.3 Composés phénoliques	35
1.1.4.3.4 Les alcaloïdes	35
1.1.5 La durabilité naturelle.....	36
1.1.5.1 Extractibles et métabolites secondaires	36
1.1.5.2 Les interactions plantes-champignons.....	36
1.1.5.3 Composés antifongiques constitutifs et induits.....	37
1.1.5.4 Mesure de la durabilité naturelle.....	38
1.2 Modèle bio-inspiré et objectifs	38

PARTIE 2. Sélection d'espèces amazoniennes spécialisant un bois durable	41
2.1 La Guyane française	41
2.2 Critères de sélection.....	42
2.3 Monographies succinctes des espèces collectées.....	44
2.3.1 Famille des Annonaceae.....	45
2.3.2 Famille des Euphorbiaceae	46
2.3.3 Famille des Humiriaceae.....	47
2.3.4 Famille des Lauraceae.....	48
2.3.5 Famille des Leguminosae, tribu des Caesalpinioideae.....	49
2.3.6 Famille des Leguminosae, tribu des Mimosoideae.....	50
2.3.7 Famille des Leguminosae, tribu des Papilioideae	54
2.3.8 Famille des Moraceae.....	56
2.3.9 Famille des Sapotaceae.....	57
2.3.10 Famille des Vochysiaceae.....	59
2.4 Connaissances phytochimiques sur les espèces sélectionnées.....	60
2.4.1 Espèce de la famille des Annonaceae	60
2.4.2 Espèce de la famille des Euphorbiaceae.....	60
2.4.3 Espèce de la famille des Humiriaceae	61
2.4.4 Espèce de la famille des Lauraceae.....	61
2.4.5 Espèce de la famille des Leguminosae, tribu des Caesalpinioideae	61
2.4.6 Espèce de la famille des Leguminosae, tribu des Mimosoideae.....	62
2.4.7 Espèces de la famille des Leguminosae, tribu des Papilioideae.....	63
2.4.8 Espèce de la famille des Moraceae.....	64
2.4.9 Espèces de la famille des Sapotaceae	65
2.4.10 Espèce de la famille des Vochysiaceae	66
2.5 Conclusions sur les espèces sélectionnées.....	66
PARTIE 3. Relation entre durabilité naturelle et activités antifongiques	67
3.1 Introduction.....	67
3.2 Extraction	68
3.3 Test de perforation en agar.....	70
3.4 Test de microdilution	73
3.5 Analyses statistiques des résultats.....	78
3.6 Conclusions.....	80
3.7 Espèces sélectionnées pour la suite des travaux.....	81

PARTIE 4. Isolement, caractérisation et évaluation biologique des composés	83
4.1 Composés isolés de <i>Humiria balsamifera</i>	84
4.1.1 Données relatives à la bergénine (HB-1)	84
4.1.2 Données relatives à l'acide maslinique (HB-2), à l'acide déhydroarjunolique (HB-3) et à l'acide arjunolique (HB-4)	86
4.1.3 Etat de l'art relatif aux composés isolés	90
4.1.4 Activités biologiques des composés isolés	91
4.2 Composés isolés de <i>Peltogyne</i> sp.	93
4.2.1 Données relatives au (+)-mopanol (P-1) et au (+)-peltogynol (P-2)	93
4.2.2 Etat de l'art relatif aux composés isolés	95
4.2.3 Activités biologiques des composés isolés	95
4.3 Composés isolés de <i>Spirotropis longifolia</i>	96
4.3.1 Données relatives à la daidzéine (SP-1), la génistéine (SP-2) et à l'isoprunétine (SP-3)	99
4.3.2 Données relatives au lupéol (SP-4)	101
4.3.3 Données relatives au picéatannol (SP-5), trans-resvératrol (SP-6) et trans-oxyresvératrol (SP-10)	102
4.3.4 Données relatives à la gnétine D (SP-7)	104
4.3.5 Données relatives à la gnétine E (SP-8) et au latifolol (SP-9)	106
4.3.6 Données relatives à la spirotropone (SP-11)	110
4.3.7 Données de RMN relatives aux spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14)	112
4.3.8 Etat de l'art relatif aux composés isolés	117
4.3.9 Activités biologiques des composés isolés	118
4.4 Composés isolés de <i>Unonopsis rufescens</i>	121
4.4.1 Données relatives à l'ursuline (UR-1)	121
4.4.2 Etat de l'art relatif à l'ursuline	122
4.4.3 Activités biologiques de l'ursuline	122
4.5 Conclusions sur les composés isolés	123
PARTIE 5. Influence des composés actifs sur les croissances fongiques	125
5.1 Introduction	125
5.2 Etude par microscopie de fluorescence sur <i>T. rubrum</i> LMG0 4218	125
5.2.1 Etude de l'effet de la gnétine E (SP-8) sur la morphologie de <i>T. rubrum</i>	125
5.2.2 Etude de l'effet de l'acide maslinique (HB-2) sur la morphologie de <i>T. rubrum</i>	128
5.3 Etude de synergies	130

5.3.1	Détermination de l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnée (ICIF).....	131
5.3.2	Etude d'une combinaison impliquant l'acide maslinique (HB-2) et l'itraconazole.....	132
5.3.3	Etude d'une combinaison impliquant la bergénine (HB-1) et le fluconazole....	133
5.4	Tests d'interactions avec l'ergostérol.....	135
5.5	Concentration fongicide minimale (CFM)	138
5.6	Conclusions.....	139
Conclusions et perspectives.....		141
PARTIE 6. Matériels et méthodes		143
6.1	Contexte et lieux des travaux de recherche.....	143
6.2	Généralités sur les matériels et méthodes	144
6.2.1	Matériels biologiques	144
6.2.2	Matériels chimiques.....	144
6.2.3	Moyens analytiques.....	145
6.2.4	Microscopie.....	145
6.2.5	Traitements statistiques	145
6.2.6	Modélisations moléculaires.....	146
6.3	Matériel végétal et extraction	146
6.3.1	Collecte et identification des plantes.....	146
6.3.2	Extraction	147
6.4	Evaluation de l'activité antifongique	147
6.4.1	Champignons lignivores.....	147
6.4.2	Champignons pathogènes humains	147
6.4.3	Test de perforation en agar	148
6.4.4	Test de microdilution	149
6.5	Fractionnements.....	150
6.5.1	Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>H. balsamifera</i>	150
6.5.1.1	Etude de la fraction F ₂	150
6.5.1.2	Purification de la fraction F _{2-P}	151
6.5.1.3	Etude de la fraction F ₄	151
6.5.1.4	Purification de la fraction F _{4-G}	153
6.5.1.5	Purification de la fraction F _{4-H}	153
6.5.1.6	Purification de la fraction F _{4-I}	153
6.5.1.7	Purification de la fraction F _{4-J}	153
6.5.1.8	Conclusions sur le fractionnement de l'extrait de bois de <i>H. balsamifera</i>	153
6.5.2	Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>Peltogyne</i> sp.....	156

6.5.3	Extraits de <i>S. longifolia</i>	157
6.5.3.1	Extrait à l'acétate d'éthyle des racines	157
6.5.3.1.1	Etude de la fraction F ₅	158
6.5.3.1.2	Purification de la fraction F _{5-B}	159
6.5.3.1.3	Purification de la fraction F _{5-G}	159
6.5.3.1.4	Purification de la fraction F ₆	159
6.5.3.2	Extrait à l'acétate d'éthyle des racines adventives.....	162
6.5.3.2.1	Purification des fractions F ₉ et F ₁₁	162
6.5.3.3	Conclusions sur le fractionnement de ces extraits.....	162
6.5.3.4	Données analytiques des composés nouveaux	163
6.5.4	Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>U. rufescens</i>	168
6.6	Influence des composés actifs sur les croissances fongiques	168
6.6.1	Etude par microscopie de fluorescence.....	168
6.6.2	Etude de synergie.....	169
6.6.3	Etude de l'interaction des composés avec l'ergostérol.....	171
6.6.4	Concentration fongicide minimale	172
6.7	Activités cytotoxiques	172
	Bibliographie.....	175
	Annexes 1 : Analyses statistiques.....	195
	Annexes 2 : Spectres RMN	197
	Annexes 3 : Spectres de dichroïsme circulaire	215
	Annexes 4 : Spectres UV	217
	Annexes 5 : Spectres IR.....	219

Table des figures

Figure 1 Mycélium d'un champignon forestier (Photo: Docanski concept ©).....	19
Figure 2 Structures de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique d'une cellule fongique (Selitrennikoff, 2001).....	20
Figure 3 Voies d'actions des traitements antifongiques, selon Mathew et Nath (2009).....	25
Figure 4 Structures de l'amphotéricine B (à g.) et de la nystatine (à d.).....	26
Figure 5 Structure de la griséofulvine	26
Figure 6 Structure de la nikkomyicine Z.....	27
Figure 7 Structure de la sordarine	27
Figure 8 Structure de trois équinocondines antifongiques	28
Figure 9 Structure de la terbinafine (à g.) et de la naftifine (à d.).....	29
Figure 10 Structures de quelques azoles antifongiques	30
Figure 11 Structure de la 5-fluorocytosine.....	31
Figure 12 Evolution du nombre de publications et du nombre de brevets relatifs aux composés antifongiques d'origine naturelle (source: www.scopus.com ; www.google.com/patents).....	33
Figure 13 Photo satellite de la forêt Amazonienne (Photo: Patrick Murriss).....	41
Figure 14 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>U. rufescens</i>	45
Figure 15 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>G. amazonicum</i>	46
Figure 16 Section radiale du bois (à g.) et inflorescence (à d.) de <i>H. balsamifera</i>	47
Figure 17 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>L. guianensis</i>	48
Figure 18 Section radiale du bois (à g.) et coupe du tronc (à d.) de <i>Peltogyne</i> sp.	49
Figure 19 Section radiale du bois (à g.) et tronc (à d.) de <i>B. pedicellaris</i>	50
Figure 20 Base du fût (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>E. shomburgkii</i>	51
Figure 21 Section radiale du bois (à g.) et détail de l'écorce (à d.) de <i>I. alba</i>	52
Figure 22 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>Z. racemosa</i>	53
Figure 23 Section radiale du bois (à g.) et tronc (à d.) de <i>H. flavum</i>	54

Figure 24	Détail des feuilles (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>S. longifolia</i>	55
Figure 25	Section transversale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>B. guianense</i>	56
Figure 26	Section transversale du bois (à g.) et base du fût (à d.) de <i>M. huberi</i>	57
Figure 27	Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>M. guyanensis</i>	58
Figure 28	Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de <i>E. uncinatum</i>	59
Figure 29	La liriodénine (à g.) et l'ursuline (à d.).....	60
Figure 30	Détail de l'écorce de <i>H. balsamifera</i> (à g.) et structures de la bergénine (milieu) et de la quercétine (à d.)	61
Figure 31	Le (+)-mopanol (à g.) et le (+)-peltogynol (à d.).....	62
Figure 32	Enterolosaponines A (1) et B (2)	63
Figure 33	Production de rejets à la base du tronc de <i>S. longifolia</i>	64
Figure 34	Artisanat fait de <i>B. rubescens</i> (à g.) et structure de la bufotéine (à d.).....	65
Figure 35	La sapotille (à g.) et la cryptolépine (à d.).....	66
Figure 36	Mesure d'un halo d'inhibition de la croissance fongique sous l'action d'extraits ..	71
Figure 37	Pourcentages d'extraits ayant une CIM $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ en fonction de la classe de durabilité des bois des espèces étudiées	78
Figure 38	Pourcentage d'extraits actifs sur <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 ou <i>C. albicans</i> ATCC 10231 pour chaque valeur de CIM (en $\mu\text{g/ml}$) en fonction la classe de durabilité	79
Figure 39	Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle de <i>H. balsamifera</i>	84
Figure 40	Isocoumarine 5, 6-dihydrogénée.....	85
Figure 41	Structure du cycle A	89
Figure 42	Structure du cycle E	89
Figure 43	Structure des cycles A et E connectés	89
Figure 44	Composés isolés de <i>Peltogyne</i> sp.: le (+)-mopanol (P-1) (à g.) et le (+)-peltogynol (P-2) (à d.).....	93
Figure 45	Molécules isolées de <i>Spirotropis longifolia</i>	98
Figure 46	Structures de la daidzéine (SP-1 , à g.), la génistéine (SP-2 , milieu) et l'isoprunétine (SP-3 , à d.)	99
Figure 47	Structure du lupéol (SP-4)	101

Figure 48 Structures du picéatannol (SP-5 , à g.), <i>trans</i> -resvératrol (SP-6 , milieu) et <i>trans</i> -oxyresvératrol (SP-10 , à d.)	102
Figure 49 Structure de la gnétine D (SP-7).....	104
Figure 50 Structure de la gnétine E (SP-8) et du latifolol (SP-9).....	106
Figure 51 Structure de la spirotropone (SP-11).....	110
Figure 52 Structures des spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14).....	112
Figure 53 Visualisation tridimensionnelle de la spirotropine A avec les distances entre les hydrogènes au niveau de l'enchaînement C6, C6a, C11a.....	115
Figure 54 Corrélations NOESY déterminantes pour l'établissement la configuration relative de SP-12 et SP-13	116
Figure 55 Structure de l'ursuline (UR-1) isolée de <i>U. rufescens</i>	121
Figure 56 Actions de la gnétine E sur la morphologie des hyphes de <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 dans une concentration sub-inhibitrice de 1 µg/mL (Colorant : Calcofluor white) ; A et B: contrôles négatifs sans traitement ; C,D,E et F : avec traitement.....	126
Figure 57 <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 non traité coloré au Calcofluor White (détail).....	127
Figure 58 <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 traité avec 1 µg/mL de gnétine E (SP-8) (détail).....	127
Figure 59 Effet de l'acide maslinique (HB-2) à 4 µg/mL sur <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 ; (Colorant: Calcofluor White) ; A et B: Contrôles négatifs ; C, D, E et F: avec traitement ...	129
Figure 60 <i>T. rubrum</i> LMGO 4218 traité avec l'acide maslinique (HB-2) à 4 µg/mL (détail)	130
Figure 61 Représentation d'un isobogramme	132
Figure 62 Isobogramme de l'acide maslinique en association avec l'itraconazole sur le champignon dermatophyte <i>M. gypseum</i> LMGO 10.....	133
Figure 63 Isobogramme de la bergénine en association avec le fluconazole sur <i>C. albicans</i> LMGO 102.....	135
Figure 64 Effet de différentes concentrations d'ergostérol exogène (50-250 µg/mL) sur le CIM de l'amphotéricine B, du picéatannol (SP-5), de la gnétine E (SP-8) et de la bergénine (HB-1) pour <i>C. albicans</i> ATCC 10231	137
Figure 65 Chromatogramme (ELSD) de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>H. balsamifera</i>	150
Figure 66 Chromatogramme (ELSD) de la fraction F _{2-p}	151
Figure 67 Chromatogrammes (ESLD) des fractions F _{4-G} (1), F _{4-H} (2), F _{4-I} (3) et F _{4-J} (4).....	152

Figure 68 Schéma récapitulatif du protocole de fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>H. balsamifera</i> , tests CIM (en µg/mL) effectués sur <i>C. albicans</i> ATCC 10231....	155
Figure 69 Chromatogrammes des fractions F ₁ (ELSD) et F ₁₋₅ (UV, à 254 nm en noir, 345 nm en rouge).....	156
Figure 70 Profil chromatographique (ELSD) de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines (en noir) et des racines adventives (en bleu) de <i>S. longifolia</i>	157
Figure 71 Profil chromatographique (ELSD) de la fraction F ₅ issu de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de <i>S. longifolia</i>	158
Figure 72 Profil chromatographique (ELSD) de la fraction F ₆ issue de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de <i>S. longifolia</i>	159
Figure 73 Schéma récapitulatif du protocole de fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de <i>Spirotropis longifolia</i> , tests CIM (en µg/mL) effectués sur <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	161
Figure 74 Structure de la spirotropone (SP-11)	163
Figure 75 Structure de la spirotropine A (SP-12)	163
Figure 76 Structure de la spirotropine B (SP-13)	164
Figure 77 Structure de la spirotropine C (SP-14)	165
Figure 78 Dilutions en série du contrôle positif (50 µL) dans la plaque test.....	169
Figure 79 Dilutions en série du contrôle positif (50 µL) dans la plaque de dilution	170
Figure 80 Plaque de test d'interaction synergique	171

Liste des tableaux

Tableau 1 Espèces sélectionnées pour les travaux	43
Tableau 2 Rendements obtenus par les extractions des différents organes des plantes étudiées	69
Tableau 3 Diamètres d'inhibition (mm) de croissance de <i>T. mentagrophytes</i> sous l'action des extraits obtenus à partir des plantes sélectionnées	72
Tableau 4 Valeurs de la concentration inhibitrice minimale (CIM, en µg/mL) des extraits étudiés sur <i>T. rubrum</i> LMG0 4218 et <i>C. albicans</i> ATCC 10231	75
Tableau 5 Activité antifongique des 10 extraits sélectionnés (CIM, en µg/mL)	77
Tableau 6 Données de RMN relatives à la bergénine (HB-1)	85
Tableau 7 Données de RMN relatives à l'acide maslinique (HB-2), l'acide déhydroarjunolique (HB-3) et l'acide arjunolique (HB-4)	87
Tableau 8 Valeurs de CIM (µg/mL), capacités antiprolifératives (%) et CI ₅₀ (µg/mL) des composés HB-1 , HB-2 , HB-3 et HB-4	92
Tableau 9 Données de RMN relatives au (+)-mopanol (P-1) et au (+)-peltogynol (P-2)	94
Tableau 10 Valeurs de CIM (µg/mL) et capacités antiprolifératives (CI ₅₀ en µg/mL) du (+)-mopanol	96
Tableau 11 Données de RMN relatives à la daidzéine (SP-1), la génistéine (SP-2) et l'isoprunétine (SP-3)	100
Tableau 12 Données de RMN relatives au lupéol	101
Tableau 13 Données de RMN relatives au picéatannol (SP-5), au <i>trans</i> -resvérol (SP-6) et au <i>trans</i> -oxyresvérol (SP-10)	103
Tableau 14 Données de RMN relatives à la gnétine D (SP-7)	105
Tableau 15 Données de RMN relatives à la gnétine E (SP-8) et au latifolol (SP-9)	107
Tableau 16 Données de RMN relatives à la spirotropone (SP-11)	110
Tableau 17 Données de RMN relatives aux spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14)	113
Tableau 18 Concentrations inhibitrices minimales (CIM, µg/mL), capacités antiprolifératives (%) et CI ₅₀ (µg/mL) des composés isolés de <i>S. longifolia</i> : daidzéine (SP-1), génistéine (SP-2), isoprunétine (SP-3), lupéol (SP-4), picéatannol (SP-5), <i>trans</i> -resvérol (SP-6), gnétine D	

(SP-7), gnétine E (SP-8), latifolol (SP-9), <i>trans</i> -oxyresvératrol (SP-10), spirotropone (SP-11), spirotropine A (SP-12), spirotropine B (SP-13) et spirotropine C (SP-14).....	119
Tableau 19 Données de RMN relatives à l'ursuline (UR-1).....	121
Tableau 20 Concentrations inhibitrices minimales (CIM, µg/mL) et capacités antiprolifératives (%) de l'ursuline (UR-1).....	123
Tableau 21 Indice de concentration inhibitrice fractionnée (ICIF) de l'acide maslinique avec l'itraconazole sur <i>M. gypseum</i> LMGO 10.....	132
Tableau 22 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	134
Tableau 23 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	134
Tableau 24 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur <i>C. albicans</i> LMGO 102.....	134
Tableau 25 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur <i>C. glabrata</i> LMGO 44.....	134
Tableau 26 Test d'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol sur <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	136
Tableau 27 Valeur de CIM et de CFM pour les composés isolés et les contrôles positifs sur <i>C. albicans</i> ATCC 10231 et <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	138
Tableau 28 Masses et rendements des composés isolés de <i>H. balsamifera</i>	154
Tableau 29 Activités et masses des fractions issues de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de <i>S. longifolia</i>	158
Tableau 30 Masses et rendements des composés isolés de <i>S. longifolia</i>	162
Tableau 31 Corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A, B et C.....	166

INTRODUCTION

L'étude de la valorisation des ressources naturelles, et particulièrement celles du biome Amazonien, constitue un des défis principaux de l'humanité pour un développement durable. L'Amazonie, avec ses 6 millions de km², héberge près de 40 000 espèces de plantes (Da Silva *et al.*, 2005) et fournit des biens essentiels tels que du bois, des aliments, des plantes médicinales et des ressources importantes pour la recherche de médicaments. Ce biome est le plus grand réservoir de diversité biologique de la biosphère et est classé au Patrimoine mondial de l'humanité par l'UNESCO (WHC, 2005).

En forêt équatoriale amazonienne, les végétaux ont élaboré au long de leur évolution des stratégies de défenses en réponse aux stress environnementaux auxquels ils sont exposés. Les arbres en particulier, qui dans certains cas vivent plusieurs centaines d'années, ont acquis des moyens de résister aux agents responsables de la biodégradation (Nemli *et al.*, 2006). Ces agents biologiques sont de diverses origines, et les champignons lignivores dégradant du bois et les champignons phytopathogènes en font partie. Ainsi, les arbres ont développé la capacité de produire des métabolites secondaires antifongiques pour pouvoir se défendre contre ces champignons (Bednarek et Osbourn, 2009).

D'un autre côté, les champignons sont aussi responsables d'infections chez les animaux et l'être humain. Le nombre de patients atteints par ces maladies nommées mycoses augmente fortement chaque année. Cette importante augmentation de l'incidence est due principalement à l'augmentation du nombre de personnes sensibles et immunodéprimées, mais également au développement de résistances aux traitements par les champignons pathogènes. Certaines souches pathogènes provoquent ainsi de graves problèmes de santé publique, particulièrement les levures du genre *Candida* (Pfaller et Diekema, 2007).

Toutefois, l'arsenal thérapeutique actuellement disponible pour combattre les infections fongiques humaines se compose de traitements médicamenteux lourds et non exempts d'effets secondaires indésirables (Wingard et Leather, 2004). Parmi les molécules sur le marché, les composés azolés (fluconazole, itraconazole...), les allylamines (terbinafine, naftifine), les equinocandines (caspofungine...) et les macrolides polyéniques (amphotéricine B, nystatine) constituent les principales thérapies utilisées (Odds *et al.*, 2003). Cette palette

médicamenteuse reste limitée et peut se révéler inefficace à traiter certains cas. Pourtant, ces dernières années, des études ont montré que l'utilisation de médicaments en association pourrait être plus pertinente (Powers, 2004). En effet, l'association thérapeutique est un moyen prometteur pour permettre l'augmentation des chances de guérison, diminuer le développement de résistances fongiques et le temps de traitement (Nguyen *et al.*, 1995 ; Shao *et al.*, 2006).

Les composés antifongiques peuvent agir aussi bien sur les champignons phytopathogènes que sur les champignons parasites humains (Rahalison *et al.*, 1994), car les champignons possèdent des propriétés physiologiques et métaboliques communes. Ainsi, les métabolites secondaires qui protègent les végétaux contre la dégradation fongique pourraient devenir de bons candidats pour le développement de composés antimycotiques.

Ce travail a donc pour objectifs de sélectionner et récolter des espèces d'arbres du biome Amazonien possédant un bois résistant à la dégradation fongique, à partir desquels il est proposé d'isoler, d'identifier et de valoriser les composés responsables de la résistance de ces bois durables, le but ultime étant de découvrir des composés prometteurs pour le traitement d'affections fongiques humaines.

PARTIE 1. CONTEXTE DE L'ETUDE

1.1 Généralités

1.1.1 Caractéristiques générales des champignons

Les champignons appartiennent au règne *Fungi* ou *Mycota*. Ce sont des organismes hétérotrophes par rapport au carbone : ils se nourrissent en extrayant de leur environnement des composés organiques déjà constitués. Ils ne possèdent pas de racine ni de feuille, et leur appareil végétatif appelé mycélium peut être unicellulaire dans le cas des levures, ou pluricellulaire dans le cas de champignons filamenteux (Figure 1). Les champignons présentent une reproduction sexuée, asexuée ou éventuellement parasexuée.



Figure 1 Mycélium d'un champignon forestier (Photo: Docanski concept ©)

1.1.1.1 La cellule fongique

Les champignons, les végétaux et les animaux sont, au niveau cellulaire, tous des organismes vivants se différenciant principalement au niveau de la structure de l'enveloppe cellulaire et de la composition du cytoplasme. L'enveloppe de la cellule fongique est constituée d'une paroi et d'une membrane, tout comme la cellule végétale.

La paroi fongique (Figure 2) est composée à 80% de polysaccharides antigéniques et est formée de 3 couches (Selitrennikoff, 2001) :

- 1 La couche interne, constituée de chitine, assure le maintien et la rigidité de la paroi ;
- 2 La couche intermédiaire, constituée de β -(1,3)-glucane, qui confère une certaine élasticité à la paroi, est aussi le lieu d'ancrage des manoprotéines ;
- 3 La couche externe, constituée de manoprotéines

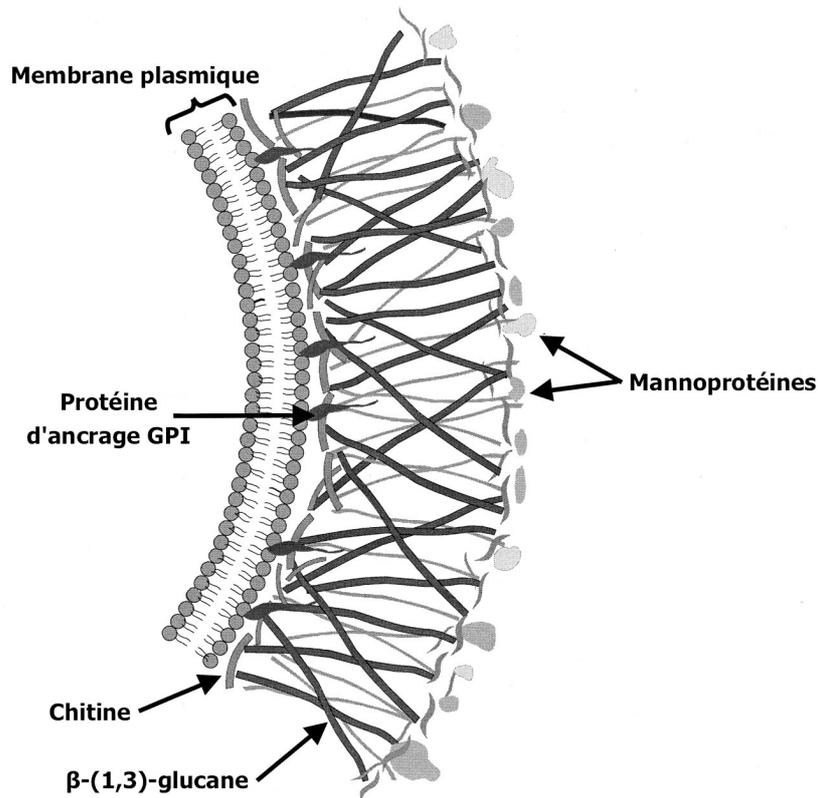


Figure 2 Structures de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique d'une cellule fongique (Selitrennikoff, 2001)

La chitine est localisée entre la membrane et la paroi, elle permet ainsi le maintien de l'intégrité de la paroi et donc la survie des cellules. La membrane cellulaire est riche en stérols (ergostérol et zymostérol). De nombreux antifongiques interfèrent avec la synthèse de ces stérols, spécifiques de la cellule fongique et absents des cellules animales. D'autres agissent également au niveau des constituants de la paroi, et dans certains cas à l'intérieur du cytoplasme ou du noyau.

1.1.1.2 Mode de nutrition

Les champignons sont des êtres hétérotrophes ; ils ont besoin de composés organiques préformés dans leur proche environnement pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Ils peuvent obtenir ces composés de quatre façons différentes (Steffoff, 2007) :

Par saprophytisme – Les champignons peuvent se nourrir de matière organique morte ou en décomposition. Ils sont alors appelés champignons saprophytes et on les rencontre principalement en forêt. Ces champignons participent au recyclage de la matière organique et libèrent alors des éléments minéraux essentiels dans l’environnement, comme l’azote, le phosphore et le carbone.

Par mutualisme – Ceci est une interaction champignon-hôte où les deux espèces tirent un bénéfice de cette relation. Le bénéfice est réciproque et obligatoire pour la survie des deux espèces, comme c’est le cas des mycorhizes.

Par commensalisme – Le champignon commensal profite d’un hôte sans lui nuire ni lui apporter de bénéfices. Dans le cas d’une interaction plante-champignon, la plante sert seulement de support physique au champignon.

Par parasitisme – Les champignons parasites vivent aux dépens d’une autre espèce, que ce soit un autre champignon, une plante ou un animal. Souvent, ces champignons provoquent des maladies pouvant entraîner la mort de l’hôte.

Il peut être noté que les 3 derniers modes de nutrition, mutualisme, commensalisme et parasitisme sont des catégories de symbioses (Redman *et al.*, 2001 ; Schaible et Kaufmann, 2005) où il existe divers niveaux de dépendance du symbiote par rapport à l’hôte.

Dans le cas du parasitisme, les champignons sont capables de dégrader leurs substrats grâce à l’utilisation d’enzymes digestives adaptées au substrat (lignine, cellulose ou kératine).

1.1.2 Les infections fongiques humaines

Les infections fongiques représentent un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde. Les mycoses peuvent apparaître sous la forme d’une simple infection superficielle jusqu’à former des lésions systémiques graves et débilitantes, associées à des taux de mortalité élevés (Hay, 2006 ; Lupi *et al.*, 2005).

Les maladies fongiques, ou mycoses, sont généralement divisées en 5 groupes selon le tissu infecté et le mode de pénétration dans l'hôte : (1) infections superficielles, (2) cutanées, (3) sous-cutanées, (4) systémiques ou invasives provoquées par des pathogènes primaires, (5) systémiques ou invasives provoquées par des pathogènes opportunistes. Ces infections sont causées par des champignons pathogènes humains filamenteux ou par des levures. L'incidence de ces infections a considérablement augmenté ces dernières années, particulièrement à cause de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés (Levinson, 2006a, b)

Les mycoses superficielles apparaissent dans toutes les régions du monde et sont connues sous le nom de piedra noire, piedra blanche et *Pityriasis versicolor*. Les piedras sont des infections asymptomatiques du cheveu, rencontrées dans les régions intertropicales, atteignant les deux sexes et tous les âges (Drake *et al.*, 1996), caractérisées par l'apparition de nodules liés aux cheveux, mais rarement à la barbe et aux poils. La piedra noire est causée par les champignons appartenant au genre *Piedraia* spp. et la piedra blanche par ceux du genre *Trichosporon* spp. Le *Pityriasis versicolor* est un des désordres pigmentaires les plus fréquents au monde (Sunenshine *et al.*, 1998) provoqué par des champignons appartenant au genre *Malassezia* et induisant une hyper ou hypopigmentation de la peau infectée, souvent aux bras, dans le dos, au cou ou au ventre (Szepietowski *et al.*, 2000).

Les mycoses cutanées, qui atteignent la couche externe de la peau, sont généralement appelées mycoses inflammatoires ou dermatophytoses. Ces maladies sont cosmopolites et très fréquentes (Pfaller et Sutton, 2006). Les dermatophytoses sont provoquées par un groupe de champignons appelés dermatophytes composé des genres *Trichophyton*, *Microsporum*, et *Epidermophyton*. Ces champignons sont kératinophyles et ont une affinité pour les cheveux, les poils, la peau et les ongles. La prévalence des infections unguéales atteint des taux de 10 à 20%, faisant de son agent pathogène principal, *Trichophyton rubrum*, un des champignons infectieux le plus répandu (Aly, 1994).

A quelques rares exceptions près, les mycoses sous-cutanées – mycétomes, sporotrichoses, chromoblastomycoses, etc. – se trouvent confinées aux régions intertropicales et subtropicales. La transmission se produit par inoculation traumatique du champignon dans la peau. L'agent pathogène peut rester confiné aux tissus sous-cutanés ou derme, mais certaines souches sont capables de causer des lésions graves, pouvant affecter les muscles et les os. Là encore, l'immunodéficience est un facteur aggravant (Lupi *et al.*, 2005).

Les mycoses systémiques ou invasives provoquées par des pathogènes primaires sont des infections graves, car les champignons responsables peuvent se disséminer par les vaisseaux sanguins et lymphatiques de l'hôte, provoquant des blastomycoses, coccidioïdomycoses et histoplasmoses. Les organismes responsables des mycoses systémiques sont intrinsèquement virulents et atteignent les patients sains.

L'augmentation du nombre de patients transplantés, de l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs et de la prévalence du SIDA (Pinto *et al.*, 2007) favorisent l'apparition de maladies opportunistes dont les agents infectieux sont des souches habituellement non pathogènes. Les espèces de champignons les plus fréquentes sont *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*. Elles provoquent des infections systémiques ou muco-cutanées telles que les candidoses, cryptococcoses et aspergilloses.

1.1.3 Traitement des infections fongiques

1.1.3.1 Historique

Jusqu'à la fin du XIX^e siècle, les seuls médicaments disponibles pour le traitement des mycoses superficielles étaient les sels inorganiques comme le permanganate de potassium ou l'arsenic. Au début du XX^e siècle, les premiers médicaments antifongiques organiques topiques ont été introduits, comme l'acriflavine, le violet de gentiane, l'acide benzoïque et l'acide acétylsalicylique (Gupta et Cooper, 2008).

La difficulté principale dans la découverte de composés antifongiques est due à la ressemblance structurale entre les cellules fongiques et les cellules des mammifères. Cette ressemblance induit que les molécules antifongiques sont généralement toxiques pour les cellules des mammifères (Georgopapadakou et Walsh, 1996).

Les traitements plus spécifiques des infections fongiques ont été découverts au milieu du XX^e siècle. La première molécule fut isolée de l'ascomycète *Penicillium griseofulvum* en 1939, la griséofulvine. En 1950 fut isolée la nystatine de l'actinobactérie *Streptomyces noursei* ; et en 1955 l'amphotéricine B de *Streptomyces nodusus*. En 1963 fut synthétisée la 5-fluorocytosine ; et en 1969 apparurent les azoles tels que le clotrimazole, l'éconazole, l'isoconazole et le tioconazole (Chabasse *et al.*, 1999).

1.1.3.2 Les traitements actuels

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent être divisés en 5 groupes selon leur mode d'action (Odds *et al.*, 2003). Ils peuvent agir au niveau de l'enveloppe cellulaire, souvent en altérant son intégrité, mais également en agissant dans le cytoplasme. Ainsi l'acide nucléique, les synthèses protéiques, les microtubules et surtout la voie de synthèse de l'ergostérol, sont les cibles privilégiées des molécules antifongiques disponibles sur le marché (Figure 3).

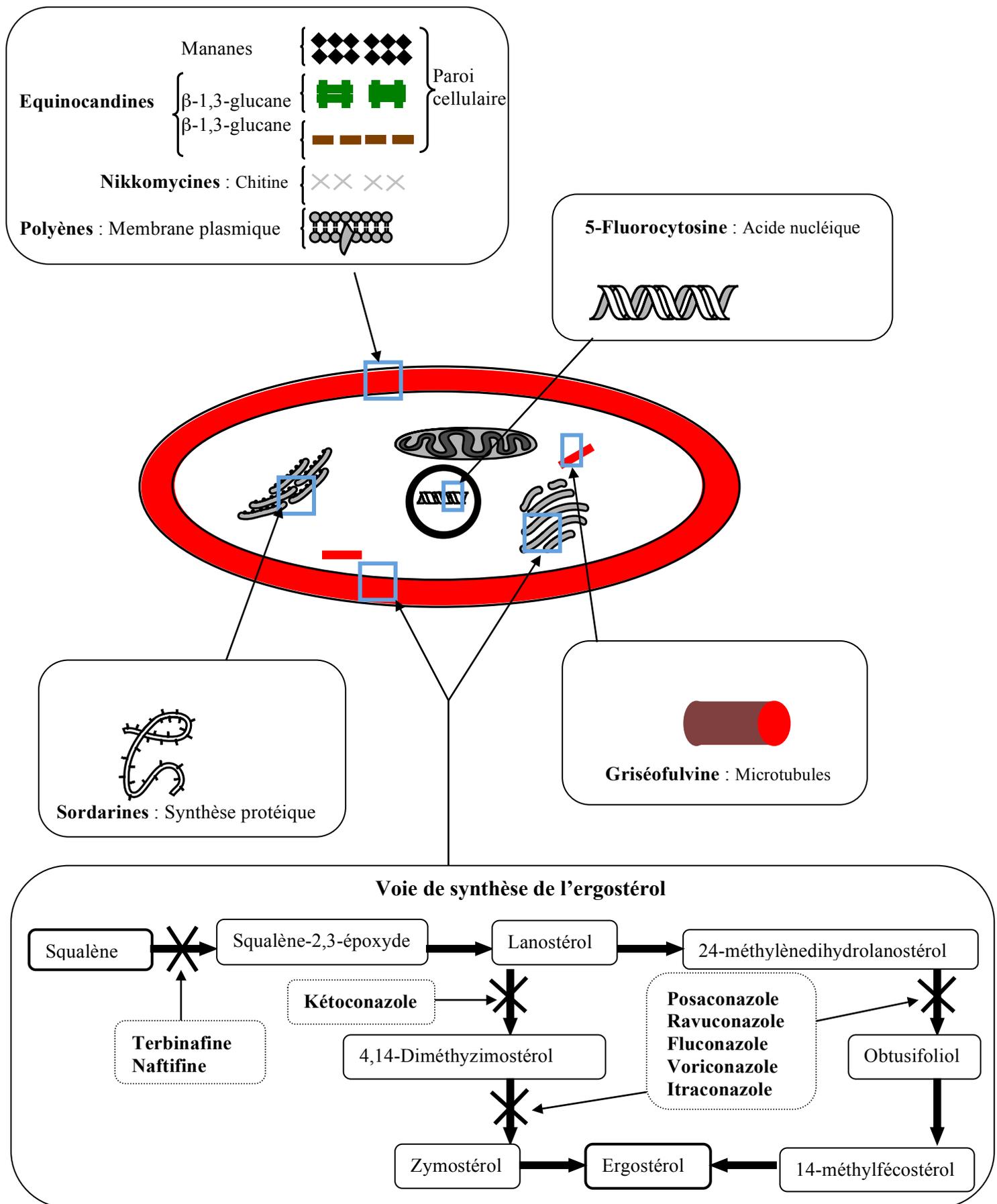


Figure 3 Voies d'actions des traitements antifongiques, selon Mathew et Nath (2009)

1.1.3.2.1 Les molécules antifongiques d'origine naturelle

1.1.3.2.1.1 Les macrolides polyéniques

Ces agents forment des complexes avec l'ergostérol et traversent la membrane plasmique du champignon, en provoquant une altération de la perméabilité de la membrane, une perte des constituants cytoplasmiques et la mort de la cellule. Ainsi, les polyènes sont fongicides et possèdent le plus grand spectre d'activité antifongique par rapport aux autres agents disponibles (Georgopapadakou et Walsh, 1996). Ce groupe est constitué de la nystatine et de l'amphotéricine B (Figure 4), isolées de souches de *Streptomyces*.

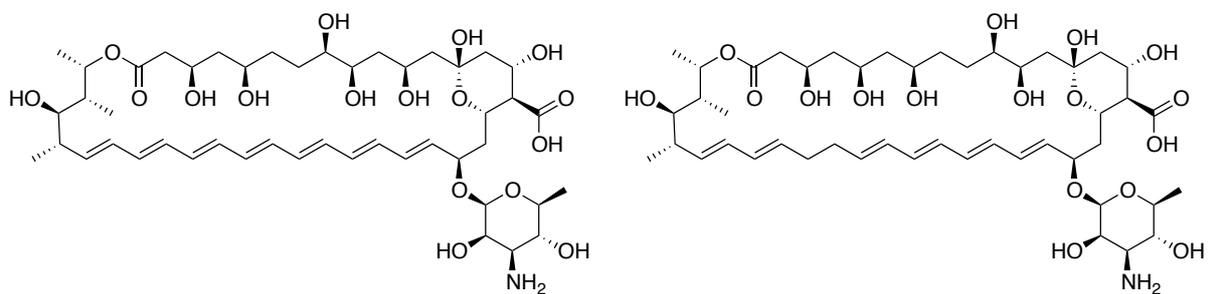


Figure 4 Structures de l'amphotéricine B (à g.) et de la nystatine (à d.)

1.1.3.2.1.2 Les benzofuranes

Cette classe est composée d'une seule molécule, la griséofulvine (Figure 5), isolée en 1939 de *Penicillium griseofulvum*. Son mécanisme d'action exact est encore mal connu. Les principales hypothèses sont soit l'inhibition de la mitose des cellules fongiques, soit l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques et des composants de la paroi (Develoux, 2001).

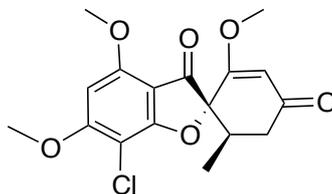


Figure 5 Structure de la griséofulvine

1.1.3.2.1.3 Les nikkomycines

Les nikkomycines sont des inhibiteurs compétitifs des enzymes de synthèse de la chitine fongique, isolées à partir de *Streptomyces tend*a (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1992). La nikkomycine Z (Figure 6) est le principal représentant de cette classe d'antifongiques.

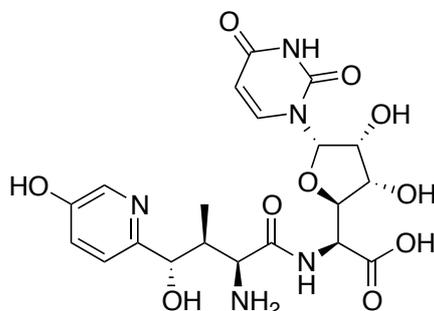


Figure 6 Structure de la nikkomycine Z

1.1.3.2.1.4 La sordarine

La sordarine (Figure 7) fut isolée d'une souche de *Streptomyces* sp. (Hauser et Sigg, 1971). Elle inhibe une cible mise en jeu dans la production de protéines fongiques, appelée facteur 2 de translation/élongation (Domínguez et Martín, 1998).

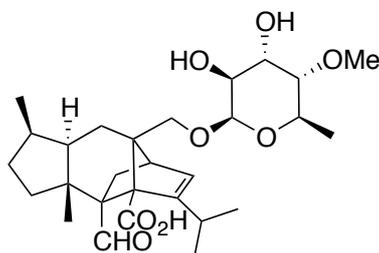


Figure 7 Structure de la sordarine

1.1.3.2.2 Les molécules antifongiques semi-synthétiques

1.1.3.2.2.1 Les équinocondines

Cette classe d'antifongiques date des années 1970 avec la découverte de l'équinocondine B, isolée d'une culture d'*Aspergillus* sp. Les équinocondines sont des lipopeptides inhibiteurs de la synthèse de la paroi fongique. Plus précisément, les équinocondines inhibent la β -(1,3)-D-glucane synthétase, un complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucanes de la paroi fongique (Douglas, 2001). Les équinocondines (Figure 8) actuellement disponibles sont la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine.

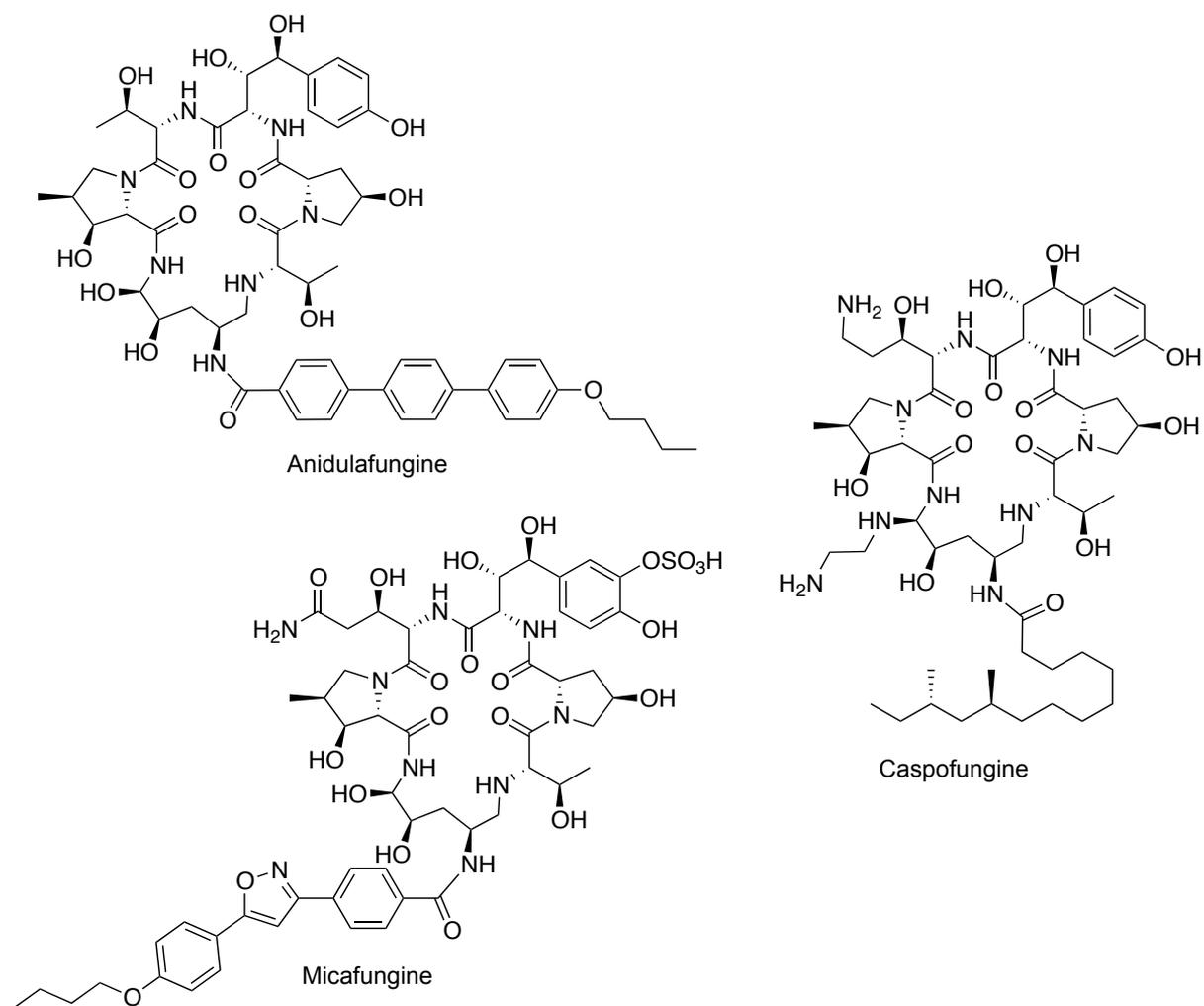


Figure 8 Structure de trois équinocondines antifongiques

1.1.3.2.3 Les molécules antifongiques d'origine synthétique

1.1.3.2.3.1 Les allylamines

La terbinafine et la naftifine (Figure 9) sont les représentants de cette classe d'antifongiques. Ce sont des inhibiteurs de la squalène époxydase, enzyme qui oxyde le squalène en squalène-2,3-époxyde (Odds *et al.*, 2003).

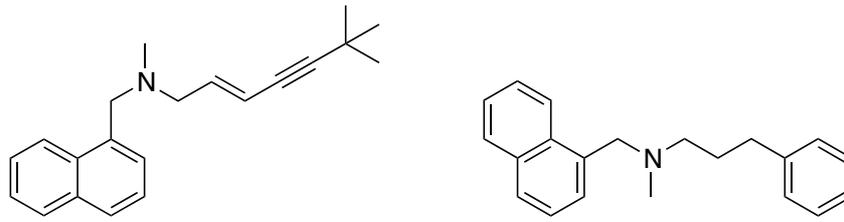


Figure 9 Structure de la terbinafine (à g.) et de la naftifine (à d.)

1.1.3.2.3.2 Les azoles

Les azoles (Figure 10) représentent une classe thérapeutique assez homogène au niveau de leur mode d'action, des effets secondaires et des interactions médicamenteuses. Ce sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme C14- α -déméthylase du cytochrome P450 (White *et al.*, 1998), responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol. Ainsi, l'exposition du champignon aux azoles provoque une déplétion de l'ergostérol et une accumulation de stérol 14- α -méthylé, perturbant la structure de la membrane.

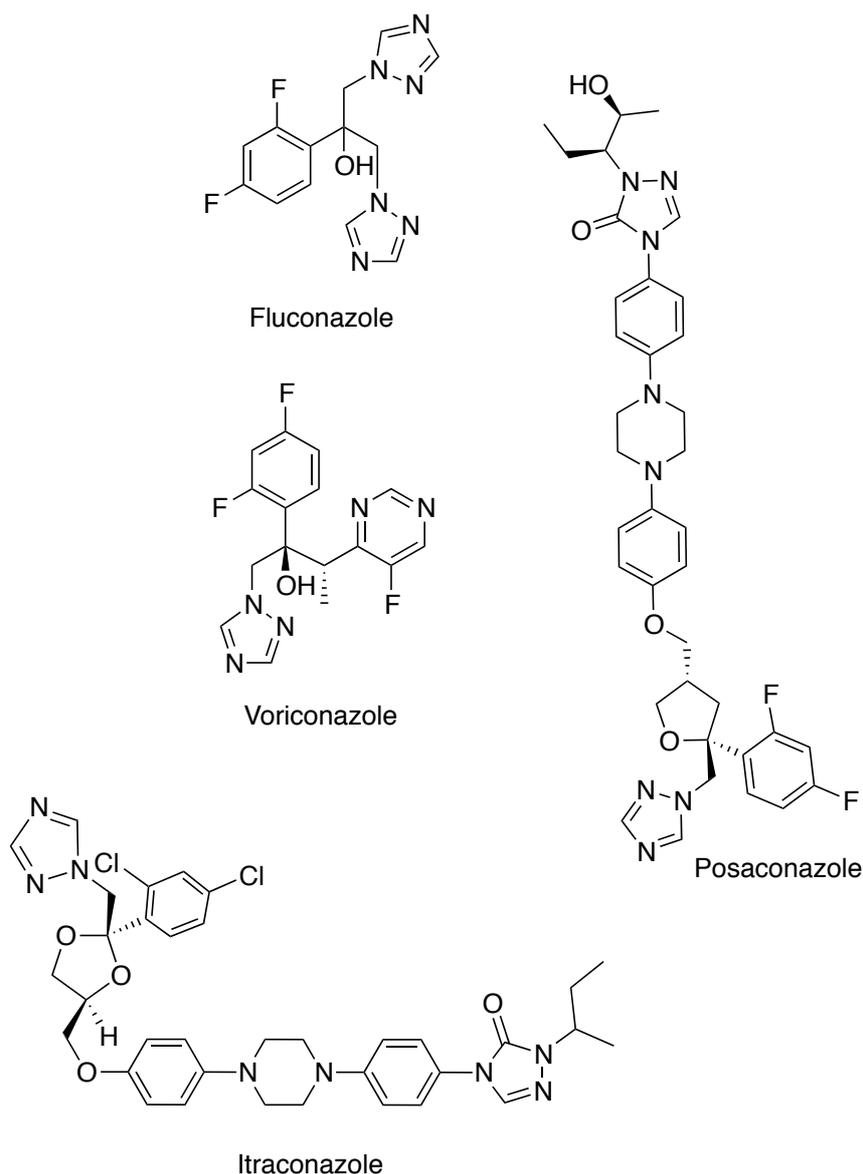


Figure 10 Structures de quelques azoles antifongiques

1.1.3.2.3.3 Les pyrimidines

La 5-fluorocytosine (Figure 11) possède un spectre d'activité réduit aux levures pathogènes. Elle est transportée à l'intérieur de la cellule fongique par une cytosine perméase, désaminée en 5-fluorouracile où elle est alors modifiée en triphosphate de nucléoside et incorporée à l'ARN, provoquant des erreurs de codage. La 5-fluorouracile est également convertie en un désoxy-nucléoside inhibant la synthèse de l'ADN (Vermes *et al.*, 2000). L'association de la 5-fluorocytosine avec l'amphotéricine B est une des thérapies les plus efficaces pour le traitement des cryptococcoses (Baddley et Pappas, 2005).

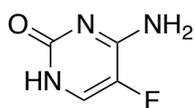


Figure 11 Structure de la 5-fluorocytosine

1.1.4 Les produits naturels antifongiques

1.1.4.1 Place des produits naturels dans la recherche pharmaceutique industrielle

Historiquement, la majorité des nouveaux médicaments a été obtenue à partir de produits naturels – i.e. métabolites secondaires – et de composés dérivés de produits naturels. Durant les 15 dernières années, la recherche pharmaceutique industrielle dans le domaine des produits naturels a diminué, notamment à cause de l'apparition de criblages à haut débit (HTS, *high-throughput screening*) de chimiothèques d'origine synthétique. Actuellement, on observe un déclin substantiel du nombre de nouveaux composés mis sur le marché et la perte imminente de brevets pour une grande part des agents thérapeutiques, alors que les ressources biologiques inexploitées, les méthodes de criblage « intelligentes », l'isolement robotisé avec analyse structurale, la métabolomique et la biologie synthétique offrent des technologies originales pour la découverte de nouveaux produits naturels.

La recherche pharmaceutique développa après la Seconde Guerre mondiale le criblage massif de microorganismes pour la découverte de nouveaux antibiotiques, en particulier suite à la découverte de la pénicilline. Dans les années 1990, environ 80% des médicaments provenaient de produits naturels ou d'analogues inspirés des produits naturels. Les antibiotiques (ex. pénicillines, tétracycline, érythromycine), les anthelminthiques (ex. ivermectine), les antipaludiques (ex. quinine, artémisine), les immunosuppresseurs (ex. cyclosporine, rapamycine) et les anticancéreux (ex. taxol, doxorubicine) ont révolutionné la médecine. Avec un tel constat, on pourrait attendre que l'identification de nouveaux métabolites secondaires à partir des organismes vivants soit le centre des efforts de la recherche pharmaceutique. Pourtant, de nombreuses entreprises pharmaceutiques ont éliminé la branche « produits naturels » de leurs activités (Li et Vederas, 2009).

La diminution de cette recherche peut s'expliquer par deux difficultés majeures : la recherche de profits des grandes firmes pharmaceutiques et les limites techniques dans la

découverte et l'identification de nouveaux composés biologiquement actifs (Li et Vederas, 2009). En effet, le coût engendré pour le développement de nouveaux médicaments à mettre sur le marché doit être compensé par la haute valeur ajoutée du produit, d'où l'intérêt pour les industries de promouvoir des médicaments rentables. Mais lorsque les brevets protégeant la fabrication de ces produits prennent fin, les revenus issus des ventes chutent de 80%. De plus, les perspectives financières des firmes engagées dans la recherche pharmaceutique sont gênées par une législation stricte, un coût important du marketing et les attentes croissantes en matière de sécurité par les agences de régulation des médicaments telles que l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Médicaments (E.M.E.A.) et la *Food and Drug Administration* (F.D.A.).

1.1.4.2 Situation actuelle de la recherche de produits naturels antifongiques

La principale difficulté pour la recherche de composés antifongiques plus efficaces et moins toxiques réside dans la similitude entre les cellules humaines et fongiques. L'exploration des ressources naturelles pourrait conduire à la découverte de nouveaux composés prometteurs, et si à ce jour, très peu de médicaments antifongiques disponibles sur le marché sont d'origine naturelle, la recherche dans ce domaine s'intensifie et le nombre de publications s'y référant n'a de cesse de progresser depuis ces dix dernières années (Figure 12).

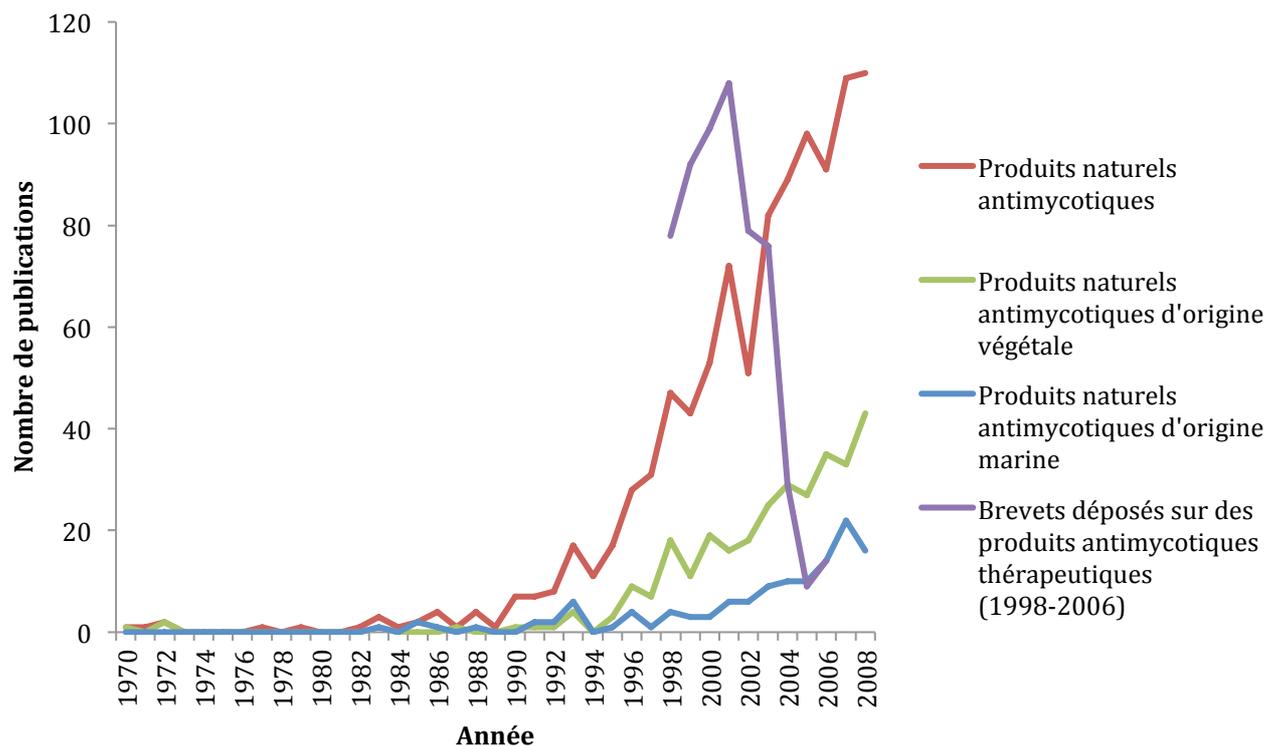


Figure 12 Evolution du nombre de publications et du nombre de brevets relatifs aux composés antifongiques d'origine naturelle (source: www.scopus.com; www.google.com/patents)

On observe depuis 10 ans une augmentation importante du nombre de publications relatives aux produits naturels antifongiques toutes origines confondues, alors que le nombre de brevets déposés chute d'une manière importante dans cette même période. Si les végétaux sont les principaux organismes étudiés, d'autres sources sont également à l'étude, comme les produits d'origine marine ou les produits provenant de microorganismes (champignons endophytes foliaires, actinomycètes, etc.). La multiplication des sources naturelles permet *in fine* l'accès à des structures moléculaires plus diversifiées que celles obtenues par synthèse (Gullo *et al.*, 2006).

Il existe à ce jour deux médicaments pour le traitement d'affections fongiques humaines sur le marché dont l'origine soit 100% naturelle : la nystatine et l'amphotéricine B. Seulement six sont des dérivés synthétiques dérivés de composés d'origines naturelles : l'anidulafungine, l'acétate de caspofongine, la micafungine de sodium, le chlorhydrate de buténafine, le liranaftate et le chlorhydrate de naftifine.

De même, il n'existe aucun médicament d'origine végétale ou inspiré d'une substance isolée d'une plante dans l'arsenal thérapeutique antifongique actuel.

1.1.4.3 Substances naturelles antifongiques d'origine végétale

On observe une demande importante de nouveaux antifongiques présentant des structures moléculaires variées, une meilleure sélectivité d'action sur de nouvelles cibles biologiques et avec moins d'effets secondaires. Les composés antifongiques issus des plantes peuvent répondre à cette demande du fait de leur grande diversité structurale, et de la permanence de l'exposition des végétaux aux attaques fongiques, particulièrement en forêt tropicale humide.

1.1.4.3.1 Terpènes et terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux. Un grand nombre de terpènes isolés à partir des végétaux supérieurs se sont révélés actifs contre de nombreux champignons humanopathogènes. Nous connaissons pourtant très mal leurs modes d'actions au niveau moléculaire. Les terpènes sont des composés hydrocarbonés formés biosynthétiquement à partir des unités pyrophosphates de diméthylallyle (DMAPP) et d'isopentényle (IPP). La formule de base des terpènes est ainsi $(C_5H_8)_n$, où n est le nombre d'unités isopréniques. Celles-ci peuvent être liées bout à bout pour former des chaînes linéaires ou être arrangées sous formes cycliques. Les terpènes peuvent être linéaires ou cycliques fonctionnalisés par des groupements hydroxyle et carbonyle, et l'on parle alors de terpénoïdes.

Le pouvoir hautement lipophile de la plupart de ces composés laisse à supposer que leurs cibles principales soient les membranes cellulaires et que leur toxicité est causée par une perte du contrôle de la pression osmotique (Cox *et al.*, 2000 ; Inoue *et al.*, 2004). Il a également été établi que la carvone et d'autres monoterpènes, provenant souvent d'huiles essentielles, inhibent aussi la transformation de plusieurs espèces appartenant au genre *Candida* spp. de la forme pseudo-unicellulaire à la forme filamenteuse, forme responsable de la plus grande virulence du microorganisme (McGeady *et al.*, 2002).

En général, les thérapies antifongiques utilisant les terpènes et leurs dérivés sont prometteuses, mais difficiles à mettre en place en raison des doses importantes qui doivent être utilisées. Ces substances peuvent néanmoins servir comme agents complémentaires lors de thérapies conventionnelles par leur pouvoir pénétrant de la peau, et ainsi être utilisées en application cutanée.

1.1.4.3.2 Saponines

Les saponines sont des hétérosides de haut poids moléculaire, composés d'une partie osidique liée à une partie aglycone triterpénique ou stéroïdique, appelée génine. La définition classique des saponines est basée sur leur activité surfactante puisque de nombreuses saponines possèdent des propriétés détergentes, donnant des mousses stables dans l'eau, ayant de plus des capacités hémolytiques, un goût amer et pouvant être ichtiotoxiques (Francis *et al.*, 2002).

Les saponines ont la propriété de former des complexes avec le cholestérol (Francis *et al.*, 2002), mais également avec l'ergostérol (Biacs et Gruiz, 1982). A ce titre, elles sont fongicides en provoquant une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et une augmentation de la perméabilité ionique (Gruiz et Biacs, 1989), et de nombreux exemples de saponines antifongiques existent dans la littérature.

1.1.4.3.3 Composés phénoliques

Ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside.

Réputés pour les propriétés antioxydantes de certains d'entre eux – en particulier les tanins – ils sont également antifongiques en particulier à l'égard des champignons phytopathogènes, et peuvent être pour cette raison considérés comme des métabolites responsables de la défense naturelle des végétaux vis-à-vis des champignons. Leur acidité relative et le nombre important de groupements hydroxyles semblent être un facteur important dans l'activité antifongique (Arreola-Cortés *et al.*, 2007), et ils entraînent alors une perturbation de l'intégrité de la structure membranaire (Nakayama *et al.*, 2006).

1.1.4.3.4 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés hétérocycliques dérivant généralement des acides aminés. Il existe de nombreux alcaloïdes antifongiques avec des structures très variées, rendant très difficile *a priori* l'interprétation de l'activité biologique d'une classe donnée. On observe pourtant que la plupart des alcaloïdes antifongiques sont hautement conjugués formant un système aromatique plan et pouvant contenir un ammonium quaternaire (Clark et Hufford, 1992). En fait, les mécanismes d'actions des alcaloïdes antifongiques sont quasi

inconnus, et leur toxicité sur les cellules humaines est généralement élevée (Molyneux et Panter, 2009).

1.1.5 La durabilité naturelle

1.1.5.1 Extractibles et métabolites secondaires

Certaines espèces, particulièrement chez les angiospermes, sont capables de résister aux agents de biodégradation tels que les insectes et les champignons. Cette aptitude s'appelle la durabilité naturelle et peut s'expliquer notamment par la présence d'extractibles (Bednarek et Osbourn, 2009). On entend par « extractibles » les composés non structuraux du bois pouvant être retirés par dissolution grâce à des solvants inertes, n'entraînant pas la dégradation et la dissolution de la paroi cellulaire ligno-cellulosique. Ces extractibles sont souvent des composés organiques de masse moléculaire faible, mais certains peuvent être également des composés polymériques ou des composés cristallins tels que l'oxalate de calcium et la silice.

Une définition simplifiée et historique divise les métabolites en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires sont des composés bioorganiques présents essentiellement dans tout l'organisme de la plante et constituent des intermédiaires dans les processus de métabolisation. Ils sont indispensables au développement et à la croissance de l'organisme.

Les métabolites secondaires sont généralement des composés dérivés des métabolites primaires et leur distribution taxonomique est limitée (Croteau *et al.*, 2000). Ils ne sont pas indispensables au développement et la croissance de l'organisme, mais le sont pour la défense des plantes dans leur environnement, en particulier contre les attaques fongiques (Bednarek et Osbourn, 2009).

Cette définition laisse toutefois une limite relativement floue entre les métabolites primaires et secondaires, certains composés pouvant être « rangés » dans l'une ou l'autre des catégories. Il vaut mieux considérer cette définition comme une simple commodité, permettant ainsi de poser les frontières entre la biochimie, liée à l'étude du métabolisme primaire, et la chimie des produits naturels, liée à l'étude du métabolisme secondaire (Dewick, 2009).

1.1.5.2 Les interactions plantes-champignons

Il est estimé à près de 250 000 le nombre d'espèces de végétaux supérieurs, alors qu'il existerait 6 fois plus d'espèces de champignons (Hawksworth, 2006). Nombre d'entre eux sont dépendants des plantes pour leur carbone et leur source d'énergie, la majorité d'entre eux étant saprophyte, c'est-à-dire vivant sur des végétaux morts, les dégradant et les recyclant en nutriments disponibles pour les végétaux vivants. Au cours de l'évolution, certains champignons ont commencé à interagir activement avec les végétaux. La plupart de ces interactions sont également avantageuses pour les plantes, pour leur croissance et leur développement par exemple. C'est le cas des mycorhizes et des endophytes (Grayer et Kokubun, 2001). Une minorité d'espèces de champignons s'est développée plus en avant, rompant l'équilibre du bénéfice mutuel en devenant des organismes pathogènes des végétaux. Pourtant, certaines espèces végétales sont résistantes à l'infection et à la dégradation fongiques, en particulier chez les arbres (Grayer et Kokubun, 2001).

Les interactions entre les arbres et leurs pathogènes sont complexes et peuvent être très spécifiques d'une combinaison donnée entre l'arbre et le champignon. Les stratégies de défenses des arbres contre leurs pathogènes sont nombreuses, et l'utilisation de défenses chimiques antifongiques en fait partie (Bednarek et Osbourn, 2009 ; Grayer et Kokubun, 2001).

1.1.5.3 Composés antifongiques constitutifs et induits

Lorsqu'une propagule de champignons rentre en contact avec la surface d'un arbre, le microclimat (température, humidité, lumière, etc.) détermine en premier lieu sa germination. Cette propagule doit ensuite pénétrer diverses lignes de défenses établies par la plante hôte avant d'atteindre une cellule vivante. Ces défenses peuvent être des barrières mécaniques comme d'une cuticule riche en cutine, mais également chimiques avec des composés naturellement présents dans le végétal capables d'inhiber la germination du spore et la croissance du champignon. Ces constituants font partie de l'arsenal de composés antifongiques constitutifs produits par les arbres, appelés également prohibitines ou phytoanticipines, pouvant être présentes dans tous les organes de l'arbre (Carneiro *et al.*, 2009). Si ces composés constitutifs ne suffisent pas à stopper la pénétration des hyphes dans l'épiderme, l'arbre met en jeu à travers une « réponse immunitaire » une cascade de processus, dont l'accumulation de composés antifongiques produits *de novo*, appelés phytoalexines (Grayer et Kokubun, 2001). Ces phytoalexines peuvent par ailleurs être

produites consécutivement à d'autres stress que l'exposition à un champignon, comme l'exposition à un rayonnement ultraviolet.

1.1.5.4 Mesure de la durabilité naturelle

La durabilité naturelle du bois est, dans l'ensemble, le degré de résistance d'un bois à l'état naturel à l'égard de toute altération d'ordre biologique, chimique ou physique. Cependant, la durabilité naturelle du bois réfère de façon spécifique de sa capacité de résistance aux agents biologiques, entre autres les champignons, les insectes et autres xylophages. Concernant la résistance aux champignons, elle est évaluée par des essais standardisés de résistance à l'attaque des pourritures. En Europe, le protocole expérimental est décrit par la norme NF EN 113 – Produits de préservation du bois – Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores – Détermination du seuil d'efficacité (Afnor, 1996). Alors que la norme NF EN 350-1 – Guide des principes d'essais et de classification de la durabilité naturelle du bois (Afnor, 1994a) définit des classes de durabilité naturelle du bois vis-à-vis des champignons lignivores, chaque classe correspondant à un niveau de durabilité ; mais il existe de nombreuses techniques de mesures, qui ont elles-mêmes évolué au cours des années.

Sommairement, dans le cas de la norme européenne NF EN 113, la résistance des bois aux champignons est déterminée sur des échantillons de dimensions normalisées mis en présence de souches de champignons dans des conditions ambiantes contrôlées. L'intensité de l'attaque des champignons, et par conséquent la résistance naturelle des bois, est quantifiée par la perte de masse des échantillons. La résistance des bois est testée sur 4 souches de champignons. La classe de durabilité contre l'attaque de champignons lignivores est notée entre 1 et 5 : classe 1 « très durable », classe 2 « durable », classe 3 « moyennement durable », classe 4 « peu durable », classe 5 « non durable » (Afnor, 1994b).

1.2 Modèle bio-inspiré et objectifs

Il a pu être observé que la durabilité naturelle correspond à la capacité de production de composés antifongiques par les arbres, entraînant la formation d'un bois résistant à la dégradation. Il existe des bases de données informant sur la durabilité naturelle d'un grand nombre d'arbres du monde, et particulièrement ceux du biome Amazonien (Gerard *et al.*, 2009 ; Granato *et al.*, 2005 ; Scheffer et Morrell, 1998). Ainsi, la première considération est

que plus un arbre est durable, plus il est capable de produire des composés à activité antifongique.

D'un autre côté, l'incidence mondiale des maladies fongiques est très élevée, avec une augmentation croissante du nombre de cas de résistances des champignons vis-à-vis des traitements disponibles (Ruhnke, 2006). Pourtant, les champignons, qu'ils soient pathogènes humains, lignivores ou phytopathogènes, possèdent des propriétés biologiques, physiologiques et structurelles communes. Ainsi, la seconde considération est que si un composé chimique – d'origine végétale et utilisé par un arbre pour se défendre – présente une activité antifongique sur les champignons lignivores, il devrait alors être également actif sur des champignons pathogènes humains (Rahalison *et al.*, 1994).

Ainsi, il était raisonnable de penser qu'en sélectionnant des arbres spécialisés dans la formation d'un bois durable, nous orienterions favorablement notre travail vers la découverte d'extraits possédant des activités biologiques sur les champignons pathogènes humains. Cette orientation favorable du criblage, grâce à l'observation de phénomènes naturels, alliée à l'utilisation de données technologiques et de l'état de l'art du domaine, ont permis d'élaborer un modèle bio-inspiré. Ce modèle a été utilisé pour sélectionner judicieusement des espèces d'arbres pour une étude chimique et biologique afin d'isoler, d'identifier, et de valoriser les métabolites secondaires antifongiques issus d'arbres durables.

PARTIE 2. SELECTION D'ESPECES AMAZONIENNES SPECIALISANT UN BOIS DURABLE

2.1 La Guyane française

La Guyane est une région ultramarine française et un département d'outre-mer localisé en Amérique du Sud avec une superficie de 83 846 km² et couvert par 96% de forêt équatoriale (Figure 13), étant ainsi l'un des territoires le plus riche du monde écologiquement parlant. Le territoire guyanais fait partie des neuf régions ultrapériphériques (RUP) de l'Union européenne. Géologiquement, elle fait partie du plateau des Guyanes, délimité par le fleuve Amazone et le fleuve Orénoque.

La forêt amazonienne de Guyane constitue une réserve importante de produits lignifiés avec ses 75 000 km², soit un tiers de la surface totale des forêts françaises pour 2% seulement de la superficie totale de l'Amazonie.



Figure 13 Photo satellite de la forêt Amazonienne (Photo: Patrick Murriss)

2.2 Critères de sélection

La première étape de cette étude était de sélectionner un certain nombre d'espèces d'arbres dont les bois possèdent des durabilités naturelles exceptionnelles. La durabilité naturelle est une donnée technologique accessible par la mesure de la perte de masse au cours du temps d'un échantillon de bois exposé à l'attaque fongique. Plus la perte de masse est faible, plus le bois est considéré comme durable, car il est capable de résister à la dégradation fongique à laquelle il a été exposé.

La durabilité de chaque espèce est établie sur la base d'une étude bibliographique et peut être noté selon : (1) – très durable, (2) – durable, (3) – moyennement durable, (4) – faiblement durable (Afnor, 1994b). Il n'a pas été récolté d'arbre appartenant à la classe (5) – non durable, puisqu'ils sortiraient du contexte de l'étude. Il a été également utilisé une base de données élaborée par le CIRAD (archive non publiée). Cette base de données renseigne sur la perte de masse d'un grand nombre d'espèces d'arbres du monde entier, et particulièrement de Guyane française. Les protocoles mis en place pour la mesure de la durabilité naturelle suivent la norme NF EN 113 (Afnor, 1996). Il existe une publication partielle de ces résultats consultables en ligne (Gerard *et al.*, 2009), mais pour certaines espèces dont les données ne sont pas publiées, les références ont été traitées comme des communications personnelles.

Les espèces sélectionnées sont décrites dans le tableau 1 et ont été choisies selon :

- 1 La durabilité naturelle du bois
- 2 L'utilisation du bois comme matériel de constructions civiles ou traditionnelles
- 3 Les informations bibliographiques existantes

Comme il a été préalablement discuté, la durabilité naturelle du bois ne renseigne pas sur la valeur qualitative ni quantitative des métabolites secondaires antifongiques éventuellement présents dans l'arbre. Ainsi, il a été considéré que l'utilisation du bois comme matériau de construction civile devait être une donnée à prendre en compte pour la sélection des espèces. L'utilisation en construction civile des bois de Guyane est abondamment décrite dans le livre de l'Office National des Forêts (ONF) intitulé *Guide de reconnaissance des arbres de Guyane* (ONF, 2004). De même, l'utilisation traditionnelle du bois comme matériau de constructions forestières en Guyane, appelées « carbets », a été considérée et renseignée par des entrevues (Otmar N'Gwete – KLR Exploitation Forestière, Matoury ; Jean-Louis Smock – IRD, Cayenne ; Jacques Beauchêne – UMR ECOFOG, Kourou ; communications personnelles).

Dans le cas de *Spirotropis longifolia*, ses capacités biologiques exceptionnelles ont été prises en compte, puisque sa monodominance pourrait être expliquée en partie par la production de composés antifongiques (Fonty *et al.*, in press).

Tableau 1 Espèces sélectionnées pour les travaux

Nom scientifique	Famille	Nom vernaculaire (Guyane)	Classe de durabilité	Référence
<i>Balizia pedicellaris</i>	Leguminosae - Mimosoideae	Assao	2	(ECOFOG, 2008)
<i>Brosimum guianense</i>	Moraceae	Amourette tachetée	2	(Chichignoud <i>et al.</i> , 1990)
<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Leguminosae - Mimosoideae	Acacia franc	1	(Chudnoff, 1984)
<i>Erismia uncinatum</i>	Vochysiaceae	Jaboty	4	(Gerard <i>et al.</i> , 2009)
<i>Glycydendron amazonicum</i>	Euphorbiaceae	Wandekole	4	(Gerard <i>et al.</i> , 2009)
<i>Humiria balsamifera</i>	Humiriaceae	Bois rouge	1	(Chudnoff, 1984)
<i>Hymenolobium flavum</i>	Leguminosae - Papilioideae	Saint martin jaune	2	(Chichignoud <i>et al.</i> , 1990)
<i>Inga alba</i>	Leguminosae - Mimosoideae	Bougouni	2	(Highley et Scheffer, 1970)
<i>Licaria guianensis</i>	Lauraceae	Cèdre	1	(De Jesus <i>et al.</i> , 1998)
<i>Manilkara huberi</i>	Sapotaceae	Balata franc	2	(Tsunoda, 1990)
<i>Micropholis guianensis</i>	Sapotaceae	Balata blanc	2	(ECOFOG, 2008)
<i>Peltogyne</i> sp.	Leguminosae - Caesalpinioideae	Amarante	1	(Chudnoff, 1984)
<i>Spirotropis longifolia</i>	Leguminosae - Papilionoideae	Bois de fer	2	Communication personnelle
<i>Unonopsis rufescens</i>	Annonaceae	Mamayawé	3	Communication personnelle
<i>Zygia racemosa</i>	Leguminosae - Mimosoideae	Bois serpent	3	(Gerard <i>et al.</i> , 2009)

Le tableau 1 expose les classes de durabilité de chaque espèce sélectionnée à partir de la bibliographie ainsi que les noms vernaculaires les plus utilisés en Guyane. Il peut être observé que 74% (11 sur 15) des espèces sélectionnées appartiennent à des classes de durabilité supérieures ou égales à 2, ce qui correspond à des espèces spécialisant un bois durable à très durable. Les autres espèces, dont les classes de durabilité sont inférieures ou égales à 3 (4 sur

11, soit 24%) correspondent à des espèces spécialisant un bois moyennement à faiblement durable. Elles ont également été sélectionnées pour leur utilisation comme matériaux de constructions traditionnelles ou d'artisanat et sont réputées à ce titre comme possédant de bonnes durabilités naturelles.

2.3 Monographies succinctes des espèces collectées

Les photos ont été prises lors des récoltes, alors que les planches d'herbiers (exsiccatas) proviennent de l'herbier néotropical en ligne du muséum de Chicago (<http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/index.php>) et les photos des coupes de bois proviennent de la base de données Mariwenn de l'UMR ECOFOG (<http://ecofog.cirad.fr/Mariwenn/>). Cette base de données renseigne également le nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane. Les descriptions botaniques proviennent d'observations faites sur le terrain et du livre *Guide de reconnaissance des arbres de Guyane* (ONF, 2004) ; les utilisations médicinales ou techniques traditionnelles en Guyane, si existantes, proviennent du livre *Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Créoles, Wayãpi, Palikur* (Grenand et al., 2004).

Les dénominations et synonymies ont été obtenues sur le site de l'herbier de Cayenne à partir de la base Aublet2 (<http://www.cayenne.ird.fr/aublet2>) et respectent l'*Index kewensis* (electronic Plant Information Centre ePIC, Royal Botanic Gardens, Kew, UK: <http://www.kew.org/epic>). La répartition géographique provient de la base *Global Biodiversity Information Facility* (<http://data.gbif.org>) et est focalisée sur les pays de la forêt Amazonienne.

Les données phytochimiques si elles existent, sont renseignées par une bibliographie la plus exhaustive possible.

2.3.1 Famille des Annonaceae

Unonopsis rufescens (Baillon) R.E. Fries

(CAY MJF798)



Figure 14 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *U. rufescens*

Synonymes

Trigynaea rufescens Baillon

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Mamayawé

Description botanique

L'arbre est de taille moyenne (inf. à 15 m), le tronc est cylindrique. L'écorce est brune, fine, se desquamant facilement. Le bois est jaune, avec une légère odeur d'amande caractéristique des Annonaceae. Les feuilles sont simples, alternes, entières, elliptiques, avec l'acumen et la base obtus, glabres, le pétiole est bombé, les nervures primaires sont saillantes et les secondaires arquées.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Bolivie, Costa Rica.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Le bois très durable est utilisé pour la construction de carbet.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été publiée jusqu'à présent.

2.3.2 Famille des Euphorbiaceae

Glycydendron amazonicum Ducke

(CAY VE139)



Figure 15 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *G. amazonicum*

Synonymes

Nealchornea amazonica

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Wandekole

Description botanique

Le tronc est peu cylindrique, à base évasée et bosselée, absence de contrefort. L'écorce externe est gris-brun avec des petites écailles irrégulières, l'écorce interne est jaunâtre à orange, avec de nombreuses veinules blanches, et pourvue à la limite de l'écorce externe d'un petit liséré rouge caractéristique. Faible exsudation résineuse claire à l'entaille. Les feuilles sont simples, alternes, entières, coriaces, elliptiques arrondies, à bases trinervées. Une paire de glandes sur le limbe près de la jonction avec le pétiole.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Utilisé pour les charpentes, la menuiserie, l'ébénisterie...

Données phytochimiques

Cette espèce contient des terpènes de type abbeokutone et des anthraquinones.

Bibliographie : (Tinto *et al.*, 1991)

2.3.3 Famille des Humiriaceae

Humiria balsamifera (J.B. Aublet) Saint-Hilaire

(CAY VE101)



Figure 16 Section radiale du bois (à g.) et inflorescence (à d.) de *H. balsamifera*

Synonymes

Aucun

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Bois rouge

Description botanique

Le tronc cylindrique est droit élancé à petits empattements mais sans contrefort, présence fréquente de lenticelles sur les empattements. L'écorce externe est noire, écailleuse avec des crevasses verticales importantes de 1 à 2 cm de profondeur et larges de 0,5 à 2 cm, à crêtes plus ou moins anguleuses. On note la présence d'une odeur balsamique agréable à l'entaille. Les feuilles sont petites, de formes variables : simples, alternes, coriaces et très lisses ; sessiles, à base engainante et embrassant la tige, à nervure primaire saillante face inférieure. On note la présence de points globuleux sur le bord des feuilles.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Une décoction de l'écorce est utilisée par les Palikur contre les rages de dents et l'érysipèle.

Utilisé pour les charpentes, la menuiserie, l'ébénisterie...

Données phytochimiques

Cette espèce contient des terpènes et flavonoïdes assez courants, ainsi que de la bergénine.

Bibliographie : (Da Silva *et al.*, 2004)

2.3.4 Famille des Lauraceae

Licaria guianensis J.B. Aublet

(CAY MJF1007)



Figure 17 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *L. guianensis*

Synonymes

Acrodiclidium aubletii Kostermans, *Licaria appellii* (Mez) Kostermans

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Cèdre

Description botanique

Le tronc est muni de contreforts concaves. L'écorce est roussâtre, gercée, l'aubier est jaunâtre, fortement odorant. Les feuilles sont alternes, faiblement pétiolées, glabres, ovales et acuminées, entières.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Son usage est limité par sa rareté.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

2.3.5 Famille des Leguminosae, tribu des Caesalpinioideae

Peltogyne sp.

(CAY RA18)



Figure 18 Section radiale du bois (à g.) et coupe du tronc (à d.) de *Peltogyne* sp.

Synonymes

Aucun

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Amarante

Description botanique

Le tronc est cylindrique et pourvu de larges contreforts, d'un diamètre atteignant 1,5 m. Les feuilles sont alternes, divisées en une paire symétrique de feuillettes larges de 5 à 10 cm de long et de 2 à 4 cm de large. Les fleurs sont petites, avec 5 pétales blancs produits en panicules.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Utilisé en menuiserie, ébénisterie et artisanat.

Données phytochimiques

Ce genre contient généralement des leucoanthocyanidines sans activité biologique connue.

Bibliographie: (Chan *et al.*, 1958 ; Malan et Roux, 1974)

2.3.6 Famille des Leguminosae, tribu des Mimosoideae

Balizia pedicellaris (A.P. De Candolle) Barneby et Grimes

(CAY PMF4403)

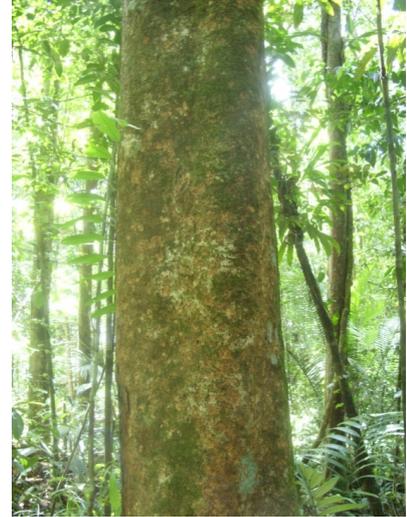


Figure 19 Section radiale du bois (à g.) et tronc (à d.) de *B. pedicellaris*

Synonymes

Inga pedicellaris A.P. De Candolle, *Feuillea pedicellaris* (A.P. De Candolle) O. Kuntze, *Mimosa terminalis* Vellozo, *Pithecellobium pedicellare* (A.P. De Candolle) Bentham, *Macrosamanea pedicellaris* (A.P. De Candolle) Kleinhoonte, *Samanea pedicellaris* (A.P. De Candolle) Killip ex Record

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Assao

Description botanique

Le tronc est à base évasée, sans contrefort, l'écorce externe est brun-orangé, l'écorce interne est orangée. Présence de sève collante, jaune clair et transparente. Les feuilles sont composées bipennées, avec 6 à 10 paires de pennes avec chacune 20 à 30 paires de foliolules coriaces, pubescentes dessous. Le pétiole porte deux glandes, le rachis porte deux glandes entre les pennes supérieures.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Le bois est utilisé en menuiserie.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

Enterolobium schomburgkii (Bentham) Bentham

(CAY PMF4976)



Figure 20 Base du fût (à g.) et exsiccata (à d.) de *E. schomburgkii*

Synonymes

Enterolobium schomburgkii (Bentham) Bentham var. *glaziovii* Bentham, *Feuillea schomburgkii* (Bentham) O. Kuntze, *Mimosa wilsonii* Standley, *Pithecellobium schomburgkii* Bentham

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Acacia franc

Description botanique

Le tronc est muni de petits contreforts, l'écorce externe est brun rougeâtre. Les feuilles sont alternes, composées bipennées, 12 à 24 paires de pennes, foliolules très fins, glabres et brillants dessus, pubérulents dessous. Pétioles avec une grosse glande à la base.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Pérou, Bolivie et Amérique centrale.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Utilisé pour les charpentes, la menuiserie, l'ébénisterie...

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

Inga alba (O.P. Swartz) C.L. Willdenow

(CAY MC1129)



Figure 21 Section radiale du bois (à g.) et détail de l'écorce (à d.) de *I. alba*

Synonymes

I. aggregata G. Don, *I. carachensis* Pittier, *I. fraxinea* C.L. Willdenow, *I. parviflora* Sagot ex Benth, *I. spruceana* Benth, *I. thyrsoides* N.A. Desvaux, *Mimosa alba* O.P. Swartz, *Mimosa fraxinea* Poiret

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Bougouni

Description botanique

Le tronc est un peu irrégulier, sub-cylindrique, élancé, souvent avec des empattements, rarement des contreforts. L'écorce est brun-orangée et se desquame en plaques irrégulières. La tranche fait de 8 à 10 mm d'épaisseur, l'écorce vivante est rougeâtre, brunissant après la coupe, fibreuse, cassante et dure ; on note la présence d'une exsudation translucide à rougeâtre immédiate. L'aubier est jaunâtre, assez dur. Les feuilles sont composées, alternes, distiques et paripennées. Une nervure primaire saillante est présente sur les deux faces.

Répartition géographique

Plateau des Guyanes, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie et Amérique centrale.

Utilisation traditionnelle

Chez les Wayãpi, l'écorce râpée et pressée est un remède contre les dermatoses buccales des enfants. Il est également utilisé par les Créoles guyanais et les Palikur pour soigner la dysenterie.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

Zygia racemosa (Ducke) Barneby et Grimes

(CAY PMF2912)



Figure 22 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *Z. racemosa*

Synonymes

Abarema racemosa (Ducke) Kleinhoonte, *Enterolobium racemosum* Ducke ex Mennega *et al.*, *Marmaroxylon racemosum* (Ducke) Killip ex Record, *Pithecellobium racemosum* Ducke, *Zygia ramiflora* (Ducke) Barneby et Grimes

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Bois serpent

Description botanique

Le tronc est non cylindrique, bosselé voir difforme. L'écorce externe est tachetée, orangé-grisâtre, très fine, se desquamant en écailles irrégulières. L'écorce interne est veinée rouge brique sur fond jaunâtre, présence d'une sève. Les feuilles sont alternes bipennées, 5 à 7 paires de pennes, à foliolules coriaces, luisantes, avec présence de glandes. Les pétioles et pétiolules sont renflés.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Pérou.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Le bois, considéré comme précieux, est utilisé en marqueterie et ébénisterie.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

2.3.7 Famille des Leguminosae, tribu des Papilioideae

Hymenolobium flavum Kleinhoonte

(CAY PMF4409)



Figure 23 Section radiale du bois (à g.) et tronc (à d.) de *H. flavum*

Synonymes

Aucun

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Saint-Martin jaune

Description botanique

Le tronc est très droit, à contreforts importants, fins et sinueux chez les individus âgés. L'écorce externe est marron avec des ocelles clairs, plus foncée vers le bas. La tranche est jaune-orangé, avec des traces noirâtres, dégageant une odeur difficilement caractérisable. Les feuilles sont situées à l'extrémité des rameaux, composées, alternes, imparipennées, en général de 15 à 25 folioles opposées, glabres dessus, couvertes d'un duvet dense et doré à la face inférieure.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Utilisé pour les charpentiers, la menuiserie, l'ébénisterie...

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

Spirotropis longifolia (A.P. De Candolle) Baillon

(CAY VE137)



Figure 24 Détail des feuilles (à g.) et exsiccata (à d.) de *S. longifolia*

Synonymes

Spirotropis candollei Tulasne, *Swartzia longifolia* De Candolle

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Bois de fer

Description botanique

Le tronc est cylindrique, cannelé à sa base et muni de contreforts avec des racines adventives. L'écorce externe est brune, fine et très dure. Les feuilles sont imparipennées (7 - 9 folioles), coriaces, glabres dessus, ovale, apex acuminé, les veinures sont bien visibles.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil.

Utilisation traditionnelle

Aucune.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

2.3.8 Famille des Moraceae

Brosimum guianense (J.B. Aublet) Huber

(CAY PMF3783)



Figure 25 Section transversale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *B. guianense*

Synonymes

Alicastrum guianense (J.B. Aublet) O. Kuntze, *Brosimum aubletii* Poepp. & Endl., *Brosimum discolor* Schott, *Brosimum lemeei* (R. Benoist) Lemée, *Brosimum rotundatum* Standley, *Brosimum velutinum* (S.F. Blake) Ducke, *Piratinera guianensis* J.B. Aublet, *Piratinera lemeei* R. Benoist, *Piratinera scabridula* S.F. Blake, *Piratinera velutina* S.F. Blake

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Amourette tachetée

Description botanique

Le tronc est muni à sa base de petits contreforts, l'écorce externe est lisse, fine et dure, l'écorce interne est granuleuse, cassante et jaune. Exsudation blanc-jaune abondante. Les feuilles sont petites, simples, alternes, distiques, elliptiques à lancéolées, à marge ondulée et à limbe coriace, acuminées.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie et Amérique centrale.

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

L'amourette tachetée est un bois précieux utilisé en ébénisterie, marqueterie et tableterie.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

2.3.9 Famille des Sapotaceae

Manilkara huberi (Ducke) Chevalier

(CAY RB1904)



Figure 26 Section transversale du bois (à g.) et base du fût (à d.) de *M. huberi*

Synonymes

Aucun

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Balata franc

Description botanique

Le tronc est droit, généralement doté de contreforts et de racines traçantes importantes. L'écorce externe est profondément fissurée, gris-brun, avec des lignes de liège verticales. L'entaille est brun-rouge avec de fines marbrures blanches, l'écorce interne est rouge-rosâtre, fibreuse, exsudant un latex blanc abondant. Les feuilles sont simples, entières, très coriaces, alternes, rassemblées à l'extrémité des rameaux. Les nervations secondaires sont parallèles, les quaternaires sont visibles. Le limbe est vert dessus et vert pubescent dessous.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil

Utilisation traditionnelle

Aucune pour ses propriétés médicinales.

Le fruit est comestible.

Son bois très dur est utilisé en ébénisterie.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

Micropholis guyanensis (A.L. De Candolle) Pierre

(CAY PMF3719)



Figure 27 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *M. guyanensis*

Synonymes

Pouteria rufa (Martius et A.W. Eichler ex Martius) Lemée, *Sideroxylon guyanense* A.L. De Candolle

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Bakuman

Description botanique

Le tronc est cylindrique avec à sa base de volumineux contreforts ailés dotés de boursouflures. L'écorce est brun foncé à brun-rouge, finement fissurée, l'écorce interne est épaisse, orange, avec la présence d'un latex blanc. Les feuilles sont simples alternes, coriaces, glabres, elliptiques à lancéolées, sans stipule ; une nervure marginale est parfois présente.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Pérou, Bolivie, Panama et Caraïbes.

Utilisation traditionnelle

Aucune.

Le bois est utilisé pour la construction.

Données phytochimiques

Cette espèce contient de la cryptolépine, un alcaloïde aux propriétés antifongiques, antibactériennes, anti-inflammatoires, antihypertensives et antipyrétiques.

Bibliographie : (Yang *et al.*, 1999)

2.3.10 Famille des Vochysiaceae

Erisma uncinatum Warming

(CAY VE4407)



Figure 28 Section radiale du bois (à g.) et exsiccata (à d.) de *E. uncinatum*

Synonymes

Aucun

Nom vernaculaire le plus utilisé en Guyane

Jaboty

Description botanique

Le fût est bosselé avec des empattements arrondis, l'écorce externe est très fine, grisâtre, écailleuse, fissurée verticalement. L'écorce interne est très fine également, rouge brique à orangée. Les feuilles sont simples, opposées ou rarement par trois, elliptiques à oblongues, glabre dessus, pubescentes étoilées dessous, à apex tronqué. Présence de stipules caduques mais à base formant un mur semi-circulaire persistant autour de la base du pétiole.

Répartition géographique

Guyane fr., Surinam, Guyana, Brésil, Venezuela, Colombie, Equateur, Pérou, Bolivie.

Utilisation traditionnelle

Aucune.

Données phytochimiques

La composition chimique de cet arbre n'a pas été décrite jusqu'à présent.

2.4 Connaissances phytochimiques sur les espèces sélectionnées

2.4.1 Espèce de la famille des Annonaceae

La seule espèce sélectionnée appartenant à la famille des Annonaceae est *Unonopsis rufescens*. Cette espèce, et en général les autres espèces du genre *Unonopsis*, est utilisée par les peuples indigènes de la Guyane française pour la réalisation de constructions forestières traditionnelles, appelées « carbets » (Otmar N'Gwete – KLR Exploitation Forestière, Matoury ; communications personnelles). Le genre *Unonopsis* a déjà été exploré d'un point de vue chimique, pourtant *U. rufescens* n'a pas été encore étudié. Dans ce genre, il a déjà été isolés des bisaporphines, des oxaporphines et des alcaloïdes azfluoréniques (De Siqueira *et al.*, 1998 ; Laprêvotte *et al.*, 1987, 1988 ; Waechter *et al.*, 1999). La liriodénine, une oxaporphine fréquemment isolée de *Unonopsis* sp., possède des propriétés cytotoxiques (Yang *et al.*, 2009) alors que l'ursuline, une azafluorénone courante chez le genre également, ne possède aucune activité biologique décrite (Figure 29).

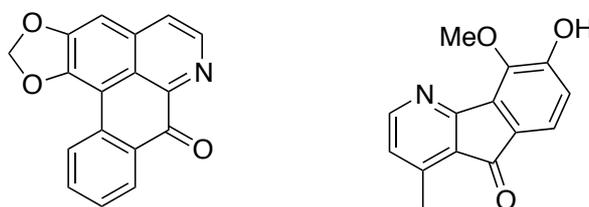


Figure 29 La liriodénine (à g.) et l'ursuline (à d.)

2.4.2 Espèce de la famille des Euphorbiaceae

Il a été récolté seulement une espèce appartenant à la famille des Euphorbiaceae, *Glycydendron amazonicum*. Il existe peu d'études sur le genre *Glycydendron*, constitué de deux espèces seulement, l'autre étant *G. espiritosantense*. Des racines et de l'écorce de *G. amazonicum* ont été isolés deux diterpènes (de types abbeokutones) et deux anthraquinones (Tinto *et al.*, 1991), qui ne possèdent pas d'activité biologique décrite.

2.4.3 Espèce de la famille des Humiriaceae

L'unique espèce collectée de cette famille est *Humiria balsamifera*. Hormis *H. balsamifera*, le genre *Humiria* et ses 42 espèces qui le composent ont été peu étudiés. Le bois de cet arbre est appelé « bois rouge » en Guyane et « *humiri* » au Brésil. Diverses molécules ont été isolées de cette espèce à partir de l'extrait à l'acétone des feuilles et des tiges : une isocoumarine (la bergénine), un flavonoïde (la quercétine), et 6 triterpènes (Calda *et al.*, 2002 ; Da Silva *et al.*, 2004 ; Dean et Walker, 1958). Ces composés (Figure 30) ont été testés sur *Plasmodium falciparum*, sans présenter d'activité (Da Silva *et al.*, 2004).

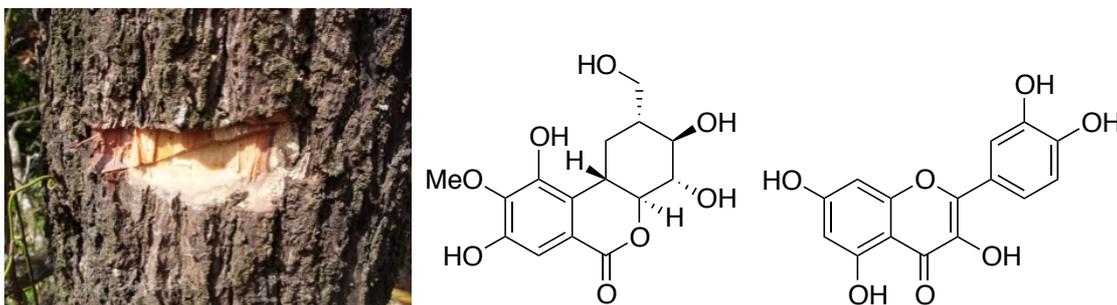


Figure 30 Détail de l'écorce de *H. balsamifera* (à g.) et structures de la bergénine (milieu) et de la quercétine (à d.)

2.4.4 Espèce de la famille des Lauraceae

La famille des Lauraceae est particulièrement connue et étudiée pour ses composés volatils et ses huiles essentielles. Le genre *Licaria* possède également des composés volatils (Alcántara *et al.*, 2010 ; Silva *et al.*, 2009) ; c'est un genre dont plusieurs espèces produisent un bois très durable qui est utilisé comme matériau de construction. Il a pu être isolé de ce genre divers composé du type néolignane (Aiba *et al.*, 1978 ; Alegrio *et al.*, 1981). Dans ce travail il n'a été récolté qu'une espèce appartenant à ce genre : *Licaria guianensis*.

2.4.5 Espèce de la famille des Leguminosae, tribu des Caesalpinioideae

Une espèce appartenant à cette tribu (sous-famille) a été récoltée, où seul le genre a pu être identifié : *Peltogyne* sp. Le bois de *Peltogyne* sp. est connu sous le nom d'amarante (*roxinho* au Brésil). Celui-ci est beige-marron au moment de la coupe, pour devenir rapidement violet lorsqu'il est exposé à la lumière. Dans le bois, il a été montré que les métabolites secondaires majoritaires sont deux leucoanthocyanidines, le (+)-peltogynol et le

(+)-mopanol (Chan *et al.*, 1958 ; Malan et Roux, 1974). Le bois des espèces de ce genre possède une haute durabilité (De Jesus *et al.*, 1998), et il a été observé que l'extrait à l'acétate d'éthyle de ce bois possède des activités antimicrobiennes (Granato *et al.*, 2005) et antifongiques (Rodrigues *et al.*, 2010).

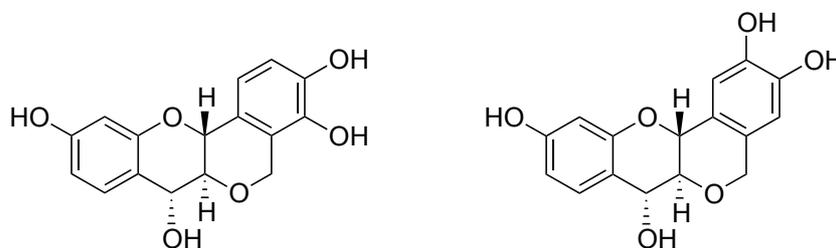


Figure 31 Le (+)-mopanol (à g.) et le (+)-peltogynol (à d.)

2.4.6 *Espèce de la famille des Leguminosae, tribu des Mimosoideae*

Il a été collecté 4 espèces appartenant à la tribu des Mimosoideae : *Balizia pedicellaris*, *Enterolobium shombrugii*, *Inga alba* et *Zygia racemosa*. Les espèces de la famille des Leguminosae-Mimosoideae sont connues pour contenir des composés polyphénoliques tels que des flavonoïdes (Botta *et al.*, 2009).

Le genre *Enterolobium* est connu principalement du fait de l'espèce *E. contortisiliquum*. Cette espèce a été assez étudiée chimiquement et plusieurs saponines triterpéniques possédant des activités cytotoxiques en ont été isolées, comme des enterolosaponines A et B (Mimaki *et al.*, 2003). Ces deux molécules sont cytotoxiques sur les macrophages de souris, et cette activité est sélective.

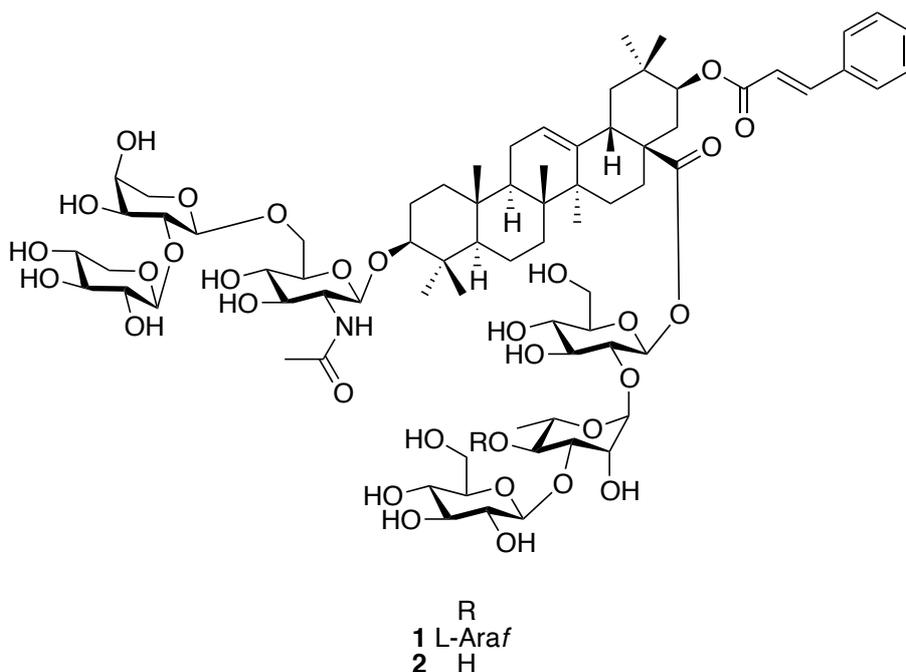


Figure 32 Enterolosaponines A (1) et B (2)

Le genre *Inga* contient plus de 30 espèces, et est connu pour renfermer des flavonoïdes (Harborne, 1997). Ces composés paraissent jouer un rôle de défense contre l'herbivorie (Lokvam et Kursar, 2005). Il a été isolé de l'espèce *I. umbellifera* des monomères et des dimères de catéchine et d'épicatéchine 3-*O*-glucocynnamoylés, mais aucune activité biologique n'a été décrite pour ces composés.

Les deux autres espèces, *B. pedicellaris* et *Z. racemosa* appartiennent à des genres botaniques qui n'ont encore pas été décrits d'un point de vue chimique.

2.4.7 Espèces de la famille des *Leguminosae*, tribu des *Papilioideae*

Il a été collecté 2 espèces appartenant à la tribu des *Papilioideae* : un individu de *Hymenolobium flavum*, et un de *Spirotropis longifolia*.

Le bois de *H. flavum* est amplement utilisé comme matériau de construction du fait de ses propriétés mécaniques et sa haute résistance à la dégradation (Chichignoud *et al.*, 1990). D'un point de vue chimique, l'espèce et également le genre n'ont pas été encore étudiés.

Spirotropis longifolia est un arbre dont l'aire de répartition s'étend de l'état du Bolívar (Venezuela) à la Guyane française. C'est l'une des rares espèces à former des peuplements

monodominants (>50% du nombre d'individus) en forêt tropicale humide (Fonty *et al.*, in press). Il se distingue aussi par une étonnante capacité à produire des rejets renouvelant constamment ses troncs et adoptant naturellement un port en taillis (Figure 33). La production de rejets est concomitante à la production de racines adventives qui permettent à l'espèce de marcotter à partir des troncs tombés au sol (Fonty *et al.*, in press). D'un point de vue taxonomique, *Spirotropis longifolia* est le seul représentant de son genre qui appartient à la sous-famille des Papilionoideae (Leguminosae). Ce genre n'a jamais été décrit phytochimiquement auparavant, et d'une manière générale il n'est pas connu pour son usage ou ses propriétés médicinales.



Figure 33 Production de rejets à la base du tronc de *S. longifolia*

2.4.8 Espèce de la famille des Moraceae

La famille des Moraceae, dont fait partie le figuier, contient quelques espèces élaborant des bois de grande durabilité naturelle. Le genre *Brosimum* a été principalement étudié à travers les espèces *B. acutifolium*, *B. utile* et *B. rubescens* ; il n'existe pas de description phytochimique de l'espèce collectée *B. guianense*. De ces espèces étudiées il a pu être isolé des flavanes (Takashima et Ohsaki, 2001 ; Teixeira *et al.*, 2000), des flavonoïdes (Takashima *et al.*, 2005 ; Torres *et al.*, 2000) dont certains sont cytotoxiques, des coumarines (Monteiro *et al.*, 2002) et également de la bufotéine (méthoxydiméthyltryptamine, figure 34), ce qui pourrait expliquer l'utilisation de *B. acutifolium* dans la préparation de boissons chamaniques (Moretti *et al.*, 2006). Le bois de *Brosimum* possède généralement une beauté singulière, faisant de *B. rubescens* une espèce très appréciée de l'artisanat (Figure 34).



Figure 34 Artisanat fait de *B. rubescens* (à g.) et structure de la bufotéine (à d.)

2.4.9 Espèces de la famille des Sapotaceae

Il a été collecté deux espèces appartenant à cette famille : *Manilkara huberi* et *Micropholis guianensis*. Le genre *Manilkara* est principalement connu pour *Manilkara zapota*, produisant la sapotille (Figure 35) riche en polyphénols (Ma *et al.*, 2003). Pourtant, il n'existe pas de publication décrivant la phytochimie détaillée du genre *Manilkara*, espèce possédant un bois hautement résistant à la dégradation fongique (Tsunoda, 1990).

Le genre *Micropholis* est très peu étudié chimiquement. Il a été publié l'isolement d'un alcaloïde de *Micropholis guianensis* : la cryptolépine (Figure 35), possédant des propriétés cytotoxiques (Yang *et al.*, 1999).

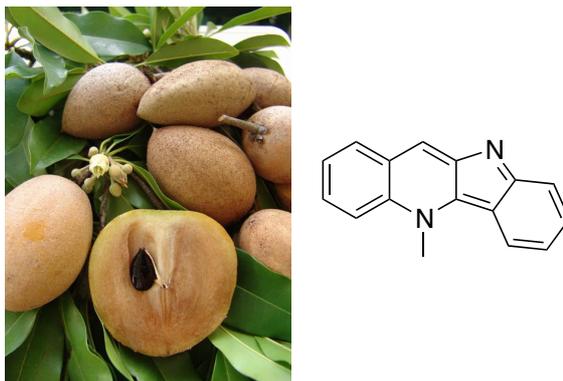


Figure 35 La sapotille (à g.) et la cryptolépine (à d.)

2.4.10 Espèce de la famille des *Vochysiaceae*

L'unique espèce collectée de cette famille est *Erisma uncinatum*, dont le bois est utilisé pour la réalisation de menuiseries extérieures et de charpentes. Le genre *Erisma* n'a jamais été décrit auparavant d'un point de vue phytochimique.

2.5 Conclusions sur les espèces sélectionnées

A partir d'une étude bibliographique et de la prise en compte de savoir locaux, il a été possible de sélectionner 15 espèces appartenant à 7 familles botaniques. Tous ces arbres possèdent des propriétés de durabilité exceptionnelle connues empiriquement ou renseignées dans la littérature ; alors qu'*a contrario*, peu de travaux décrivent leur composition phytochimique.

Une fois cette sélection effectuée, il fallait alors mettre en place des campagnes de récoltes et procéder à l'évaluation biologique des extraits issus de ces espèces afin de choisir les extraits les plus actifs pour la suite des travaux.

PARTIE 3. RELATION ENTRE DURABILITE NATURELLE ET ACTIVITES ANTIFONGIQUES

3.1 Introduction

Les espèces qui ont été sélectionnées sont connues en Guyane française pour leur durabilité naturelle exceptionnelle. La plupart de ces espèces sont utilisées comme matériaux de constructions domestiques, principalement parce qu'elles sont capables de résister à la dégradation fongique. Nous chercherons à expliquer dans cette partie comment cette résistance pourrait être expliquée par la présence de composés extractibles antifongiques. Le plan de réalisation a été mis en œuvre selon :

1. Récolte du matériel végétal
2. Mise en herbier et identification botanique
3. Extraction avec des solvants de polarité croissante (AcOEt puis MeOH) des différents organes des plantes récoltées (Ecorces, bois séparé en duramen et aubier si possible, feuilles, racines)
4. Essais biologiques : évaluation de l'activité antifongique de tous les extraits produits sur 3 souches de champignons (*T. rubrum*, *C. albicans* et *T. mentagrophytes*)
5. Essais biologiques : évaluation de l'activité antifongique de 10 extraits prometteurs sur diverses souches de champignons lignivores, dermatophytes et levures
6. Récoltes des espèces sélectionnées en grande quantité et fractionnement des extraits actifs

Grâce aux données de classe de durabilité et des valeurs d'activités antifongiques, les résultats de ce criblage ont été soumis à des tests statistiques afin d'évaluer la validité du modèle bio-inspiré.

3.2 Extraction

A partir des organes des plantes récoltées, il a été produit 60 extraits par macérations successives à l'acétate d'éthyle puis au méthanol. Les rendements d'extractions sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 Rendements obtenus par les extractions des différents organes des plantes étudiées

Espèce	Rendement (en %) à l'acétate d'éthyle			Rendement (en %) au méthanol		
	Bois	Ecorces	Autres	Bois	Ecorces	Autres
<i>Balizia pedicellari</i> (Leguminosae)	0,4	1,5		1,7	6,0^a	
<i>Brosimum guianense</i> (Moraceae)		1,0			0,7	
<i>Enterolobium schomburgkii</i> (Leguminosae)	0,6	1,5		2,5	3,0	
<i>Erisma uncinatum</i> (Vochysiaceae)	0,8	1,0		4,2	2,3	
<i>Glycydendron amazonicum</i> (Euphorbiaceae)	0,4	0,4		0,8	1,0	
<i>Humiria balsamifera</i> (Humiriaceae)	1,5	2,5	0,6 (tiges)	3,1	2,8	4,2 (tiges)
<i>Hymenolobium flavum</i> (Leguminosae)	0,6	1,2		0,9	2,9	
<i>Inga alba</i> (Leguminosae)	0,5	0,4		1,3	8,7	
<i>Licaria guianensis</i> (Lauraceae)	2,0	7,6		1,9	2,0	
<i>Manilkara huberi</i> (Sapotaceae)	2,3	3,2		9,9	9,8	
<i>Micropholis guyanensis</i> (Sapotaceae)		0,6			3,8	
<i>Peltogyne</i> sp. (Leguminosae)	3,4			4,4		
<i>Spirotropis longifolia</i> (Leguminosae)	1,7	5,4	1,0 (racines) 4,0 (racines adventives)	2,2	5,7	0,7 (racines) 6,3 (racines adventives)
<i>Unonopsis rufescens</i> (Annonaceae)	0,7	1,1		2,9	7,8	
<i>Zygia racemosa</i> (Leguminosae)	0,3	0,4		3,4	3,6	
Moyenne des rendements par organe ± erreur standard	1,2 ± 0,3	2,0 ± 0,5	1,9 ± 1,1	3,0 ± 0,8	4,3 ± 1,2	3,7 ± 2,2
Moyenne des rendements par solvant ± erreur standard		1,6 ± 0,4			3,6 ± 0,7	

^a Les rendements d'extractions marqués en gras sont situés au-dessus du troisième quartile des taux d'extraction (AcOEt : $\geq 2,08$, MeOH : $\geq 4,72$)

Il peut être observé que les meilleurs rendements d'extractions à l'acétate d'éthyle ont été obtenus pour les écorces de *Licaria guianensis* (7,6%) et les écorces de *Spirotropis longifolia* (5,4%). Quant à l'extraction au méthanol, les meilleurs rendements ont été obtenus pour les écorces de *Inga alba* (8,7%) et pour le bois et les écorces de *Manilkara huberi* (respectivement 9,9 et 9,8%). Les rendements d'extraction à l'acétate d'éthyle les plus faibles ont été obtenus pour le bois et les écorces de *Zygia racemosa* (0,3 et 0,4%). Concernant les extractions au méthanol, les plus faibles taux d'extractions ont été obtenus pour les écorces de *Brosimum guianense* (0,7%) et les racines de *Spirotropis longifolia* (0,7%).

D'une façon plus globale, les taux d'extractions à l'acétate d'éthyle sont inférieurs (1,6%) à ceux au méthanol (3,6%), et les extractions du bois à l'acétate d'éthyle produisent les plus faibles rendements (1,2%), alors que celles des écorces au méthanol produisent ceux les plus élevés (4,3%). Rappelons que sur les 15 espèces sélectionnées, 7 (47%) appartiennent à la famille de Leguminosae, qui est une famille connue pour contenir beaucoup de polyphénols (Chew *et al.*, 2011) principalement solubles dans le méthanol. En effet, les extraits méthanoliques des écorces des espèces de cette famille sont produits avec un rendement moyen de 5%, contre 3,8% pour les extraits issus d'espèces n'appartenant pas à la famille des Leguminosae.

De plus, on note une forte différence entre le rendement d'extraction des parties externes (écorces, racines adventives, tiges) avec un rendement de 3,2%, par rapport aux parties internes (bois, racines) avec un rendement moyen de 2,0%. Les parties externes contiennent effectivement le phloème, vaisseaux conducteurs de la sève élaborée riche en nutriments tels que des glucides extractibles.

3.3 Test de perforation en agar

L'activité antifongique des extraits bruts obtenus a été évaluée par la méthode de perforation en agar (Figure 36). Ce test consiste à mettre en contact avec le champignon, inoculé sur la surface du milieu gélosé, l'extrait déposé dans une cavité creusée dans le milieu. Pour les extraits actifs, il est possible d'observer un halo d'inhibition de croissance fongique dont le diamètre dépend de l'activité de l'extrait, de l'épaisseur du milieu et de la capacité de diffusion des constituants actifs dans le milieu (Webster *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible d'obtenir une évaluation qualitative de l'activité antifongique des extraits. Ce test est adéquat pour la détection rapide de l'activité de nombreux extraits, qui doivent être ensuite

soumis à un test permettant de mesurer la concentration inhibitrice par une méthode quantitative.



Figure 36 Mesure d'un halo d'inhibition de la croissance fongique sous l'action d'extraits

Les extraits obtenus et les contrôles positifs ont été soumis au test de perforation en agar sur le champignon dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 1931. La lecture des résultats des tests de perforations en agar est exprimée en mm et est exposée dans le tableau 3.

Tableau 3 Diamètres d'inhibition (mm) de croissance de *T. mentagrophytes* sous l'action des extraits obtenus à partir des plantes sélectionnées

Espèce	Organe	<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 1931	
		AcOEt	MeOH
<i>Balizia pedicellari</i>	Bois	15	13
	Ecorces	15	-
<i>Brosimum guianense</i>	Ecorces	-	-
<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Bois	13	-
	Ecorces	21	18
<i>Erisma uncinatum</i>	Bois	-	-
	Ecorces	11	-
<i>Glycydendron amazonicum</i>	Bois	-	-
	Ecorces	25^a	-
<i>Humiria balsamifera</i>	Bois	21	14
	Ecorces	25	17
	Tiges	21	20
<i>Hymenolobium flavum</i>	Bois	-	30
	Ecorces	-	25
<i>Inga alba</i>	Bois	20	-
	Ecorces	-	-
<i>Licaria guianensis</i>	Bois	10	-
	Ecorces	-	-
<i>Manilkara huberi</i>	Bois	11	-
	Ecorces	10	25
<i>Micropholis guyanensis</i>	Ecorces	-	12
<i>Peltogyne</i> sp.	Bois	-	-
<i>Spirotropis longifolia</i>	Bois	-	16
	Ecorces	-	-
	Racines	-	16
	Racines adventives	-	12
<i>Unonopsis rufescens</i>	Bois	27	-
	Ecorces	11	-
<i>Zygia racemosa</i>	Bois	10	35
	Ecorces	-	28
Itraconazole (mm)		10	
Fluconazole (mm)		20	

^a Les diamètres marqués en gras sont ceux supérieurs ou égaux à 25 mm (troisième quartile)
 - : inactif (absence de halo d'inhibition)

50% des extraits ont présenté une activité antifongique par cette méthode, avec 53% des extraits à l'acétate d'éthyle et 47% au méthanol, en considérant inactif un extrait ne présentant pas de halo d'inhibition. Toutefois, les extraits à l'acétate d'éthyle présentent en moyenne un diamètre de halo d'inhibition inférieur à ceux du méthanol (16,6 contre 20,1 mm), ce qui peut s'expliquer par le fait que les composés moins polaires pénètrent moins bien dans la gélose (Webster *et al.*, 2008). Toutefois, les plus grands diamètres d'inhibitions ont été obtenus par les extraits à l'acétate d'éthyle du bois de *Unonopsis rufescens* et par les extraits méthanoliques du bois et des écorces de *Zygia racemosa*.

Ce criblage préliminaire permet de mettre en avant quelques extraits possédant une bonne activité antifongique avec des diamètres supérieurs à 25 mm (valeur correspondant au troisième quartile), comme les extraits méthanoliques des écorces et du bois de *Hymenolobium flavum* et *Zygia racemosa*, l'extrait des écorces de *Humiria balsamifera* et l'extrait du bois de *Unonopsis rufescens*.

Comme il a été énoncé, ce protocole d'évaluation de l'activité antifongique est seulement qualitatif, le diamètre d'inhibition ne reflète pas vraiment l'activité antifongique de l'extrait puisqu'il faut considérer la capacité de pénétration des composés dans le gel d'agar, ainsi que le comportement du mycélium sur le gel. L'agar est un polymère de galactose, c'est-à-dire un gel extrêmement polaire. De plus, les extraits sont dilués dans le DMSO avant d'être déposés dans la cavité et doivent alors pénétrer dans l'agar, ce qui désavantage les composés apolaires. Egalement, certains champignons ont la capacité de s'isoler d'un milieu toxique, notamment par la formation de biofilms (Blankenship et Mitchell, 2006). Ainsi, il est nécessaire d'utiliser le test de microdilution permettant de mesurer la Concentration Inhibitrice Minimale (CIM), test décrit par le *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI).

Sur la base de son halo d'inhibition très important (27 mm), l'extrait à l'acétate d'éthyle d'*Unonopsis rufescens* avait été sélectionné pour un premier essai de fractionnement.

3.4 Test de microdilution

Ce test a été conduit selon les normes publiées par le CLSI, suivant les documents M38-A2 pour les champignons dermatophytes et M27-A3 pour les levures (CLSI, 2008a, b). Ces essais permettent d'évaluer de façon quantitative, sans biais dû à la nature de l'extrait, l'activité antifongique exprimée en $\mu\text{g/mL}$. Cette valeur correspond à la concentration minimale qui permet l'inhibition de la croissance fongique observée à l'œil nu par l'absence

de croissance dans les puits de la plaque de microdilution de 96 puits. Ainsi, plus la valeur de CIM est faible, plus la capacité antifongique de l'extrait est élevée. Les résultats des extraits évalués par cette méthode sur les souches *T. rubrum* LMGO 4218 et *C. albicans* ATCC 10231 sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 Valeurs de la concentration inhibitrice minimale (CIM, en µg/mL) des extraits étudiés sur *T. rubrum* LMGO 4218 et *C. albicans* ATCC 10231

Espèce	Organe	Souches/Solvant d'extraction			
		<i>T. rubrum</i> LMGO 4218		<i>C. Albicans</i> ATCC 10231	
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
<i>Balizia pedicellari</i>	Bois	-	-	-	-
	Ecorces	-	-	-	-
<i>Brosimum guianense</i>	Ecorces	-	-	-	-
<i>Enterolobium Schomburgkii</i>	Bois	-	-	-	-
	Ecorces	-	31,3	-	7,8
<i>Erisma uncinatum</i>	Bois	-	-	-	-
	Ecorces	-	-	-	-
<i>Glycydendron amazonicum</i>	Bois	-	-	31,3	-
	Ecorces	-	-	-	-
<i>Humiria balsamifera</i>	Bois	31,3	31,3	31,3	31,3
	Ecorces	31,3	15,6	31,3	7,8
	Tiges	31,3	31,3	-	62,5
<i>Hymenolobium flavum</i>	Bois	62,5	250,0	-	-
	Ecorces	31,3	62,5	62,5	-
<i>Inga alba</i>	Bois	-	-	-	-
	Ecorces	-	-	-	-
<i>Licaria guianensis</i>	Bois	-	62,5	-	31,3
	Ecorces	-	125,0	-	-
<i>Manilkara huberi</i>	Bois	250,0	62,5	-	31,3
	Ecorces	-	62,5	-	31,3
<i>Micropholis guyanensis</i>	Ecorces	-	125,0	-	15,6
<i>Peltogyne</i> sp.	Bois	62,5	-	31,3	-
<i>Spirotropis longifolia</i>	Bois	31,3	62,5	62,5	15,6
	Ecorces	-	-	-	-
	Racines	125,0	-	62,5	-
	Racines adventives	15,6	125,0	31,3	62,5
<i>Unonopsis rufescens</i>	Bois	250,0	-	125,0	-
	Ecorces	-	-	62,5	-
<i>Zygia racemosa</i>	Bois	-	31,3	-	250,0
	Ecorces	-	125,0	-	-
Itraconazole			4,0		0,5
Fluconazole			8,0		1,0

- : Inactif (CIM > 250 µg/mL)

Dans cette étude, 250 µg/mL ont été établis comme valeur limite d'activité au-dessus de laquelle l'extrait était considéré inactif. On peut considérer qu'un composé possède une activité antifongique intéressante s'il présente une CIM ≤ 10 µg/ml, c'est à dire une valeur proche de celle des contrôles positifs. Ceci correspondrait à une proportion de 4%, et dont les techniques actuelles de séparation permettraient l'isolement.

Il apparaît que 46,7% (28 sur 60) des extraits ont présenté une activité sur au moins une des deux souches testées. D'une manière générale, les extraits provenant du bois (xylème secondaire) ont présenté un plus grand pourcentage d'activité (56,3%, soit 18 sur 32) par rapport à ceux issus des écorces (35,7%, soit 10 sur 28). Ce haut taux de réponses positives laisse penser que la sélection d'espèces spécialisant un bois résistant à la dégradation fongique a permis de favoriser la découverte d'extraits possédant une activité antifongique. Parmi ces 60 extraits testés, 10 ont été sélectionnés pour avoir montré une bonne activité sur les champignons, tout en possédant peu d'information dans la littérature, assurant plus certainement l'isolement de composés nouveaux, ou des composés dont l'activité antifongique n'a jamais été décrite. Ainsi, ont été sélectionnés les extraits provenant du bois ou des racines ayant présenté une activité antifongique sur les deux souches testées avec au moins une activité inférieure ou égale à 62,5 µg/ml, en partant du principe que le bois et les racines sont les organes de stockage privilégiés des composés antifongiques (Rodrigues, 2010). Ainsi, ont été sélectionnés :

- Les extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol du bois de *Humiria balsamifera*
- L'extrait méthanolique du bois de *Licaria guianensis*
- Les extraits méthanoliques du bois de *Manilkara huberi*
- Les extraits du bois et des racines adventives au méthanol et des racines et des racines adventives à l'acétate d'éthyle de *Spirotropis longifolia*
- L'extrait méthanolique du bois de *Zygia racemosa*

Ces 10 extraits ont été testés par microdilution sur 3 autres souches de champignons dermatophytes : *Microsporum gypseum* LMGO 533, *Microsporum canis* LMGO 02 et *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 1931; 4 autres espèces de levures: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* LMGO 44, *Candida krusei* LMGO 174 et *Cryptococcus neoformans* LMGO 02 ; et 2 espèces de champignons lignivores : *Pycnoporus sanguineus* et *Trametes versicolor*. La réalisation de ces essais a permis d'observer le spectre d'action de ces extraits. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 Activité antifongique des 10 extraits sélectionnés (CIM, en µg/mL)

Espèce	Organe	Solvant	Dermatophyte			Levure				Lignivore	
			<i>M. g</i> LMGO 533	<i>M. c</i> LMGO 02	<i>T. m</i> LMGO 09	<i>C. p</i> ATCC 22019	<i>C. g</i> LMGO 44	<i>C. k</i> LMGO 174	<i>C. n</i> LMGO 02	<i>Pycnoporus</i> <i>sanguineus</i>	<i>Trametes</i> <i>versicolor</i>
<i>Humiria balsamifera</i>	Bois	MeOH	31,3	125,0	250,0	3,9	31,3	7,8	31,3	31,3	15,6
	Bois	AcOEt	31,3	-	125,0	7,8	62,5	15,6	31,3	31,3	62,5
<i>Licaria guianensis</i>	Bois	MeOH	31,3	15,6	31,3	7,8	62,5	7,8	62,5	62,5	7,8
<i>Manilkara huberi</i>	Bois	MeOH	125,0	-	-	-	-	250,0	-	125,0	31,3
<i>Peltogyne</i> sp.	Bois	AcOEt	-	62,5	125,0	125,0	7,8	62,5	62,5	125,0	62,5
<i>Spirotropis longifolia</i>	Bois	MeOH	62,5	62,5	250,0	-	-	7,8	-	31,3	62,5
	Racines	AcOEt	125,0	250,0	-	250,0	-	7,8	-	250,0	31,3
	Racines adventives	MeOH	250,0	-	-	-	-	62,5	-	-	31,3
	Racines adventives	AcOEt	31,3	62,5	62,5	62,5	125,0	7,8	62,5	7,8	31,3
<i>Zygia racemosa</i>	Bois	MeOH	62,5	-	62,5	-	62,5	62,5	62,5	62,5	31,3
Itraconazole			0,5	4,0	0,5	0,25	1,0	2,0	1,0	1,0	0,5

- : inactif (CIM > 250 µg/mL), *M.g.*: *Microsporium gypseum*, *M.c.*: *Microsporium canis*, *T.m.*: *Trichophyton mentagrophytes*, *C.p.*: *Candida parapsilosis*, *C.g.*: *Candida glabrata*, *C.k.*: *Candida krusei*, *C. n.*: *Cryptococcus neoformans*

En règle générale, les extraits ont présenté de très bonnes activités antifongiques, hormis l'extrait méthanolique du bois de *Manilkara huberi* et l'extrait méthanolique des racines adventives de *Spirotropis longifolia*. On peut observer qu'en général les champignons dermatophytes sont plus résistants que les levures, et que les extraits sont à la fois actifs sur les champignons pathogènes humains et sur les champignons lignivores.

3.5 Analyses statistiques des résultats

Une analyse descriptive et statistique des données obtenues à partir du criblage a été effectuée afin de déterminer si les deux hypothèses directrices de notre étude pouvaient être validées, à savoir : (1) La sélection d'arbres spécialisant un bois durable permet d'orienter favorablement la découverte d'extraits possédant une activité antifongique et (2) Les extraits antifongiques issus de cette approche possèdent un large spectre d'activité à la fois sur les champignons pathogènes humains et sur les champignons lignivores.

Sur la figure 37, il peut être observé les pourcentages d'extraits actifs ($CIM \leq 250 \mu\text{g/mL}$) en fonction de la classe de durabilité des bois des espèces étudiées. Grâce à cette représentation, il peut être aisément observé que les espèces spécialisant un bois durable produisent un taux d'extraits actifs plus élevé. En effet, 57% des extraits produits par les espèces appartenant à la classe 1 sont actifs, alors qu'aucun extrait issu d'espèces de la classe 4 n'est actif. Les espèces notées classe 2 et 3 ont quant à eux un pourcentage d'extraits actifs semblable, avec 40% et 38% respectivement.

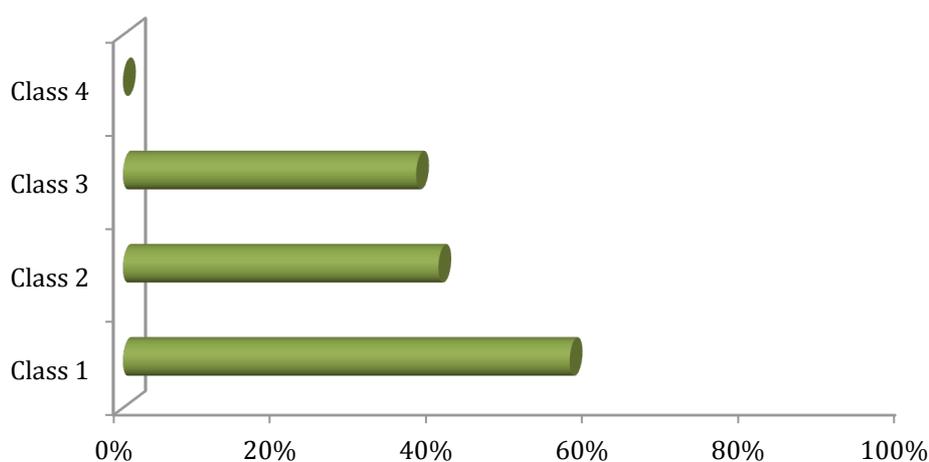


Figure 37 Pourcentages d'extraits ayant une $CIM \leq 250 \mu\text{g/mL}$ en fonction de la classe de durabilité des bois des espèces étudiées

Il est possible d'expliciter et de détailler ce graphique en exprimant les valeurs de CIM obtenues pour chaque classe de durabilité. La figure 38 représente le pourcentage d'extraits actifs obtenus pour chaque valeur d'activité (CIM, $\mu\text{g/mL}$), en fonction de la classe de durabilité des bois de chaque espèce étudiée. Cette représentation permet d'observer les valeurs d'activités les plus fréquemment rencontrées (le mode) pour chaque classe de durabilité. Il en ressort que dans cette sélection, plus une espèce spécialise un bois durable, plus ses extraits présentent une activité antifongique élevée.

Il peut ainsi être dégagé deux influences de la classe de durabilité sur l'activité des extraits : d'une part plus une espèce spécialise un bois durable, plus il y a de chance que l'extrait possède une activité antifongique ($\text{CIM} \leq 250 \mu\text{g/mL}$). D'autre part, les extraits actifs issus d'espèces durables posséderont en général des activités antifongiques plus prononcées que ceux issus d'espèces moins durables. Cette étude démontre sans ambiguïté que la durabilité naturelle des bois est le plus souvent le résultat de l'auto-imprégnation avec des métabolites secondaires antifongiques extractibles.

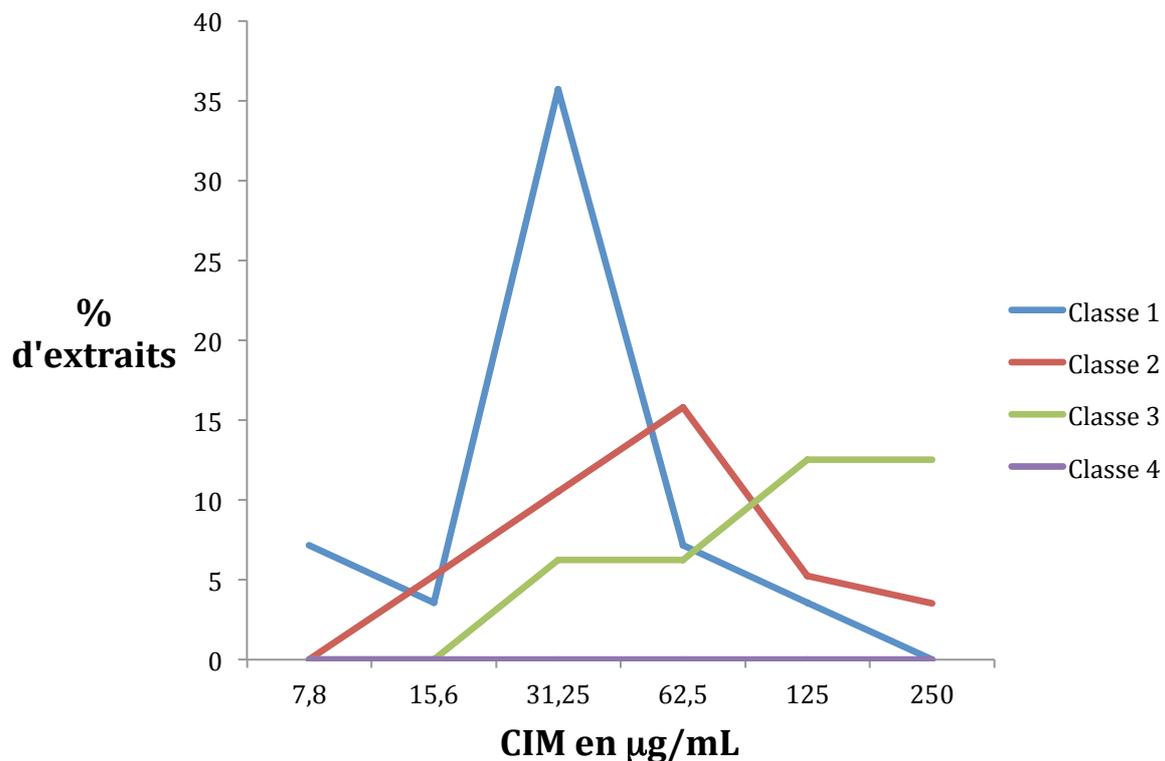


Figure 38 Pourcentage d'extraits actifs sur *T. rubrum* LMGO 4218 ou *C. albicans* ATCC 10231 pour chaque valeur de CIM (en $\mu\text{g/ml}$) en fonction la classe de durabilité

Afin de vérifier statistiquement cette influence, un test du χ^2 de Pearson au seuil de risque $\alpha = 0,01$ a été effectué pour détecter une influence de la classe de durabilité naturelle sur l'activité antifongique des extraits (Annexe 1, p. 195). Les résultats montrent une différence significative entre chaque classe de durabilité naturelle, ce qui indique que la durabilité du bois d'une espèce est bien un critère de sélection pour rechercher des extraits à activité antifongique. Il y a en effet plus de chance d'obtenir un extrait possédant une activité antifongique à partir d'une espèce d'arbre spécialisant un bois plus durable.

En ce qui concerne les essais des 10 extraits sur les diverses souches de champignons (levures, dermatophytes et lignivores), il a été conduit un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis au seuil de risque $\alpha = 0,01$ afin de comparer les valeurs d'activités antifongiques obtenues avec les champignons dermatophytes, les levures et les champignons lignivores. Pour ce faire, une classification des CIM a été adoptée selon $R_1 = 3,9 \mu\text{g/mL}$, $R_2 = 7,8 \mu\text{g/mL}$, $R_3 = 15,6 \mu\text{g/mL}$, $R_4 = 31,25 \mu\text{g/mL}$, $R_5 = 62,5 \mu\text{g/mL}$, $R_6 = 125 \mu\text{g/mL}$, $R_7 = 250 \mu\text{g/mL}$ et $R_8 \geq 500 \mu\text{g/mL}$ (Annexe 1, p. 196). Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les trois catégories de champignons ($p > 0,05$); elles ont donc toutes les trois une sensibilité équivalente, et les extraits testés possèdent un large spectre d'activité. Les extractibles provenant de bois durables possèdent donc des propriétés antifongiques à la fois sur les champignons pathogènes humains (dermatophytes et levures) et envers les champignons dégradants du bois.

3.6 Conclusions

Grâce aux résultats obtenus dans cette étude, il a été établi que parmi les espèces d'arbres de Guyane française, la probabilité de détecter une activité antifongique (CIM $\leq 250 \mu\text{g/mL}$) sur au moins une souche de champignons humanopathogènes est plus élevée ($p < 0,01$) lorsque l'espèce possède une forte durabilité naturelle. Il a pu également être démontré que les extraits de bois actifs obtenus possédaient un large spectre d'activité à la fois sur les dermatophytes, les levures et les lignivores ($p > 0,05$). Un criblage suivant un modèle bio-inspiré peut donc s'établir par (1) la sélection d'espèces spécialisant un bois durable, à partir de données bibliographiques, et (2) l'évaluation de l'activité antifongique des extraits sur un nombre restreint de souches fongiques, sachant qu'un extrait actif le sera probablement sur plusieurs souches de champignons, que ce soient des dermatophytes, des levures ou des

lignivores. Ces conclusions suggèrent que l'approche bio-inspirée peut être utile pour faciliter la découverte de plantes et de composés possédant une activité antifongique.

3.7 Espèces sélectionnées pour la suite des travaux

A partir de ce criblage bio-inspiré, il a été possible de sélectionner 5 autres espèces, en plus d'*Unonopsis rufescens* qui avait été préalablement choisi sur la base des tests de perforation : *Humiria balsamifera*, *Licaria guianensis*, *Peltogyne* sp., *Spirotropis longifolia* et *Zygia racemosa*.

Toutefois, *Zygia racemosa* est une espèce relativement rare en Guyane et *Licaria guianensis* est particulièrement difficile à identifier, et il a donc été décidé de ne pas sélectionner ces espèces dans le cadre de cette étude.

Il a ainsi été sélectionné 5 extraits appartenant à 4 espèces différentes pour procéder aux travaux d'isolements :

- L'extrait à l'acétate d'éthyle du bois d'*Humiria balsamifera*
- Les extraits à l'acétate d'éthyle des racines et des racines adventives de *Spirotropis longifolia*
- L'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Peltogyne* sp.
- L'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Unonopsis rufescens*, sélectionné sur la base des tests de perforation en agar

A partir de ces extraits sélectionnés, il a été entrepris d'isoler les composés pouvant être responsables de l'activité antifongique. Dans la partie suivante, il est décrit le processus d'identification des composés isolés, sur la base des analyses de RMN principalement, mais également les résultats des tests d'activités antifongiques et de cytotoxicités. Ces informations chimiques et microbiologiques ont permis d'amener un complément d'information important pour la connaissance chimiotaxonomique des espèces étudiées, mais surtout de sélectionner certaines molécules prometteuses pour la découverte de composés aux propriétés antimycotiques.

PARTIE 4. ISOLEMENT, CARACTERISATION ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES COMPOSES

A partir des résultats présentés dans le chapitre 3, il a été possible de mettre en avant l'activité antifongique d'extraits issus d'espèces spécialisant un bois durable.

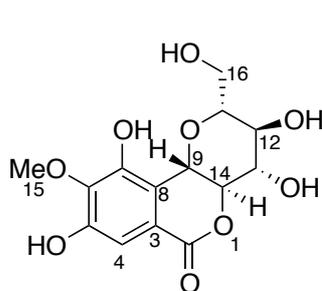
Ces extraits ont été évalués pour leurs capacités antifongiques sur des champignons pathogènes humains, en supposant que les substances responsables de la durabilité naturelle des bois pouvaient agir également comme composés antimycotiques. Cette étude préliminaire a permis de sélectionner 5 extraits qui ont été soumis à un processus de fractionnement bioguidé. Cette technique permet l'isolement des molécules supposées responsables de l'activité biologique, par répétition du processus « fractionnement par des moyens chromatographiques/évaluation de la capacité antifongique des fractions obtenues ».

Les molécules ont été considérées actives sur une souche de champignon donnée lorsqu'elles présentaient une valeur de CIM $\leq 64 \mu\text{g/mL}$, ce qui correspond à la valeur limite du fluconazole (CLSI, 2008a, b). Les composés qui présentaient de bonnes activités antifongiques, c'est-à-dire un spectre d'activité comparable à ceux des contrôles positifs, ont alors été testés pour leur cytotoxicité sur la lignée cellulaire MRC5 (poumon fœtal humain sain) ; et sur la lignée MDA-MB-435 (mélanome), souche cancéreuse sensible pertinente dans le cas d'un traitement topique (Rae *et al.*, 2007), dans une gamme de concentrations de 128,0 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Ceci a permis alors de calculer l' CI_{50} exprimée en $\mu\text{g/mL}$, qui est la concentration permettant d'inhiber 50% de la prolifération cellulaire, et de calculer l'indice de sélectivité ($\text{CI}_{50}/\text{CIM}$). Les composés sans activité antifongique ont été testés sur la lignée cellulaire KB (carcinome buccal), afin de détecter une éventuelle capacité anticancéreuse qui pourrait être exploitée dans d'autres travaux. Cet essai a consisté à l'observation de l'activité antiproliférative à 10^{-5} M. Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues avec le docetaxel, anticancéreux utilisé pour le traitement des cancers du sein, du poumon et de la prostate (Eisenhauer et Vermorken, 1998).

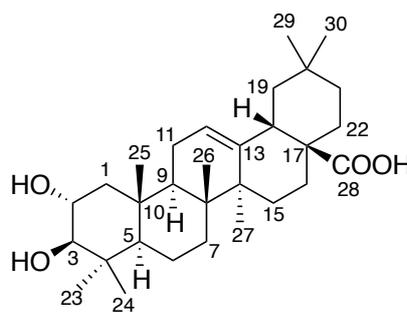
L'objectif de ce chapitre est donc de décrire la caractérisation, l'état de l'art et l'activité antifongique ainsi que la cytotoxicité des substances naturelles antifongiques isolées à partir des extraits sélectionnés.

4.1 Composés isolés de *Humiria balsamifera*

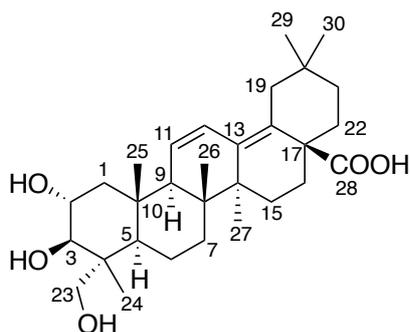
Il a pu être isolé 4 molécules à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *H. balsamifera*. A partir de plusieurs étapes de fractionnement, il a pu être obtenu et identifié la bergénine (**HB-1**), l'acide maslinique (**HB-2**), l'acide déhydroarjunolique (**HB-3**) et l'acide arjunolique (**HB-4**). Les structures sont présentées dans la figure 39.



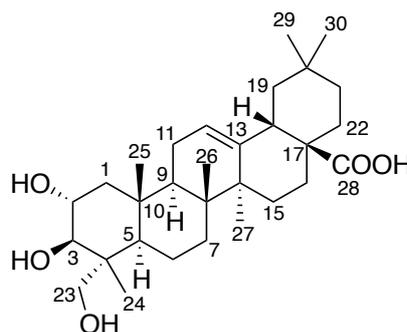
HB-1 : Bergénine



HB-2 : Acide maslinique



HB-3 : Acide déhydroarjunolique



HB-4 : Acide arjunolique

Figure 39 Composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *H. balsamifera*

4.1.1 Données relatives à la bergénine (HB-1)

Le spectre de RMN de ce composé a été réalisé dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis d'établir sa structure sont décrits dans le tableau 6.

Tableau 6 Données de RMN relatives à la bergénine (HB-1)

¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY ^a	HMBC (¹ H → ¹³ C) ^a
2	165.7		
3	119.4		
4	111.0		C2, C3, C5, C6, C7, C8,
5	152.3		
6	142.3		
7	149.4		
8	117.3		
9	74.2	H14	C3, C6, C7, C8, C11, C13, C14
11	83.0	H12, H16	C12, C16
12	71.9	H11, H13	C11, C13, C16
13	75.6	H12, H14	C12, C14
14	81.4	H9, H13	C8, C9, C13
15	60.9		C6
16	62.7	H11	C12

^a Les interactions faibles sont notées en italiques

Le singulet à δ_H 7,07 (1H, s, H-4) et les corrélations HMBC H1→ C2, C3, C5, C6, C7, C8 indiquent la présence d'un cycle aromatique pentasubstitué, dont on peut envisager la substitution en 4, 5 et 6 par des atomes d'oxygène, et la présence d'un groupe méthoxy du fait de la corrélation HMBC H15→C6. D'autre part, les couplages HMBC H9→ C6, C7, C8 et H14→C8, C9 peuvent faire penser à une structure proche d'une isocoumarine 5,6-dihydrogénée (Figure 40).

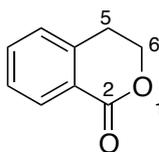


Figure 40 Isocoumarine 5, 6-dihydrogénée

Les signaux à δ_H 4,94 (1H, d, *J* = 10,4, H-9), 4,05 (1H, dd, *J* = 9,1, 8,4, H-14), 3,81 (1H, dd, *J* = 9,1, 9,1, H-13), 3,69 (1H, m, H-11) et 3,44 (1H, dd, *J* = 9,1, 9,1, H-12) sont caractéristiques d'un C-glycoside, un déblindage de 4,94 ppm faisant penser à celui d'un proton en α de l'atome d'oxygène intracyclique. Les constantes de couplages de l'ordre de 8-10 Hz nous indiquent que ces protons sont en position axiale. La masse de l'ion moléculaire (*m/z* 329,08 g/mol [M+H]⁺) est en accord avec la valeur calculée. Enfin, la valeur de pouvoir

rotatoire $[\alpha]_D^{25}$ -21,34 (MeOH, *c* 0,94), et les données de RMN sont en accord avec les données publiées (Calda *et al.*, 2002).

4.1.2 Données relatives à l'acide maslinique (HB-2), à l'acide déhydroarjunolique (HB-3) et à l'acide arjunolique (HB-4)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis d'établir leurs structures sont décrits dans le tableau 7. Au vu de la complexité du spectre proton, la multiplicité des signaux et les couplages n'ont pas pu être tous décrits.

Tableau 7 Données de RMN relatives à l'acide maslinique (HB-2), l'acide déhydroarjunolique (HB-3) et l'acide arjunolique (HB-4)

		Acide maslinique		Acide déhydroarjunolique		Acide arjunolique	
		¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
1	a	1.93 (1H, m)	48.2	2.20 (1H, dd, <i>J</i> = 12.5, 4.7)	47.5	1.90 (1H, m)	47.9
	b	0.90 (1H, m)		0.96 (1H dd, <i>J</i> = 12.5, 11.2)		1.11 (1H, m)	
2		3.62 (1H, ddd, <i>J</i> = 11.3, 9.6, 4.5)	69.5	3.76 (1H, ddd, <i>J</i> = 11.2, 9.8, 4.7)	69.8	3.69 (1H, ddd, <i>J</i> = 11.5, 9.8, 4.7)	69.7
3		2.91 (1H, d, <i>J</i> = 9.6)	84.5	3.39 (1H, d, <i>J</i> = 9.8)	78.2	3.45 (1H, d, <i>J</i> = 9.8)	78.2
4			40.5		44.2		44.2
5		0.85 (1H, m)	56.7	1.36 (1H, dd)	48.1	1.30 (1H, m)	48.2
6	a	1.57 (1H, m)	19.6	1.53 (1H, m)	19.1	1.45 (1H, m)	19.2
	b	1.44 (1H, m)		1.45 (1H, m)		1.30 (1H, m)	
7	a	1.75 (1H, ddd, <i>J</i> = 13.9, 11.7, 4.5)	33.9	1.71 (1H, m)	33.7	1.74 (1H, m)	33.9
	b	1.56 (1H, m)		1.69 (1H, m)		1.52 (1H, m)	
8			40.6		43.4		43.1
9		1.65 (1H, dd l, <i>J</i> = 10.6, 7.2)	49.1	2.08 (1H, s l)	55.8	1.7 (1H, s l)	49.1
10			39.3		38.7		38.4
11	a	1.97 (1H, m)	24.7	6.47 (1H, dd, <i>J</i> = 10.5, 3.1)	126.8	1.95 (1H, m)	24.7
	b	1.93 (1H, m)				1.93 (1H, m)	
12		5.26 (1H, t, 3.5)	123.5	5.69 (1H, dd, <i>J</i> = 10.5, 1.6)	127.4	5.25 (1H, t l)	123.4
13			145.4		137.6		144.8
14			43.0		42.0		42.2
15	a	1.78 (1H, td, <i>J</i> = 3.9, 3.7)	28.8	1.72 (1H, m)	26.2	1.77 (1H, m)	28.9
	b	1.08 (1H, td, <i>J</i> = 3.9, 3.7)		1.07 (1H, m)		1.06 (1H, m)	
16	a	2.02 (1H, m)	24.1	1.92 (1H, m)	34.0	1.61 (1H, m)	24.1
	b	1.60 (1H, m)		1.68 (1H, m)		1.57 (1H, m)	
17			47.7		49.4		46.6
18		2.86 (1H, dd, <i>J</i> = 13.7, 4.3)	42.8		133.7	2.85 (1H, dd, <i>J</i> = 14.5, 13.5)	42.8
19	a	1.70 (1H, m)	47.3	2.53 (1H, dd, <i>J</i> = 14.3, 1.95)	41.5	1.69 (1H, m)	47.3
	b	1.14 (1H, m)		1.73 (1H, dd)		1.11 (1H, m)	
20			31.7		38.1		31.7

21	a	1.40 (1H, d l, $J = 13.7$)	35.0	1.45 (1H, m)	33.4	1.22 (1H, m)	34.1
	b	1.21 (1H, d l, $J = 13.7$)		1.32 (1H, m)		1.19 (1H, m)	
22	a	1.33 (1H, m)	34.0	2.23 (1H, dd, $J = 9.6, 4.5$)	38.8	1.60 (1H, m)	33.4
	b	1.49 (1H, m)		1.37 (1H, m)		1.27 (1H, m)	
23		1.02 (3H, s)	29.4	3.52 (1H, d, $J = 9.6$)	66.1	3.50 (1H, d, $J = 11.0$)	66.4
				3.28 (1H, d $J = 9.6$)		3.35 (1H, d, $J = 11.0$)	
24		0.81 (3H, s)	17.5	0.69 (3H, s)	13.4	0.70 (3H, s)	14.3
25		1.01 (3H, s)	17.1	1.02 (3H, s)	20.1	1.03 (3H, s)	17.6
26		0.82 (3H, s)	17.8	0.81 (3H, s)	17.2	0.81 (3H, s)	17.8
27		1.17 (3H, s)	26.5	0.99 (3H, s)	20.3	1.17 (3H, s)	26.5
28			181.9		180.6		180.2
29		0.94 (3H, s)	24.0	0.82 (3H, s)	24.6	0.95 (3H, s)	24.0
30		0.91 (3H, s)	33.6	0.94 (3H, s)	32.8	0.91 (3H, s)	33.6

Le spectre de RMN de l'acide maslinique (**HB-2**) rappelle celui d'un triterpène où l'on dénombre 30 atomes de carbone, avec la présence de 7 groupes méthyle, dont 2 systèmes gem-diméthyle.

En premier lieu, l'identification de groupes deux gem-diméthyle en C23-C24 et C29-C30 portés par des atomes de carbone quaternaires et la présence des signaux à δ_H 5,26 (1H, t, $J = 3,5$, H-12) indiquent une structure triterpénique pentacyclique mono-insaturée qui devrait s'apparenter à un squelette de type oléanène.

Les valeurs de déplacement chimiques des atomes de carbone C2 (δ_C 69,5) et C3 (δ_C 84,5) et les corrélations HMBC H1→C2 ; H2→C1, C3 ; H3→C2, C4 font penser au cycle A, dihydroxylé en C-2 et C-3. La constante de couplage d'environ 10 Hz entre les protons H2 et H3 indique leurs configurations *trans* diaxiales. Les corrélations HMBC H1→C10, H5→C4, C10 et H25→C10 ; ainsi que le déplacement chimique de C-25 (δ_C 17,0) caractéristique d'un groupement méthyle en position axiale permettent d'achever la construction du cycle A (Figure 41).

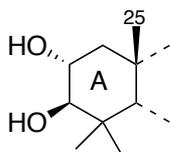


Figure 41 Structure du cycle A

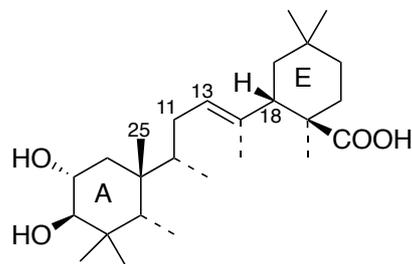


Figure 43 Structure des cycles A et E connectés

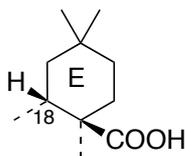


Figure 42 Structure du cycle E

Après l'identification du système gem-diméthyle C29-C20-C30, le cycle E se construit grâce aux corrélations HMBC H19→C18, C20 ; H21→C20, C22 d'une part, et les corrélations H22→C17, C21, C28 d'autre part, qui de surcroît mettent en avant la présence d'un acide carboxylique exocyclique à δ_C 181,9 (C-28) porté par un atome de carbone quaternaire en tête de pont. Cet atome de carbone quaternaire est identifiable par les corrélations HMBC dans le cycle E, et la corrélation H18→C17 permet d'identifier les atomes impliqués dans la jonction de cycle (Figure 42).

Les corrélations HMBC H12→C13, H18→C13 d'une part, et H25→C9, H11→C9 d'autre part, ainsi que la corrélation COSY H11→H12 aident à positionner la double liaison intracyclique en C12-C13, et ainsi de rejoindre les cycles A et E (Figure 43).

L'attribution des autres signaux relatifs à la molécule se fait ensuite de proche en proche grâce aux corrélations HMBC et COSY (H5→C6, H5→H6, H6→C7, H6→C7 etc...). Toutefois, le positionnement des groupements méthyle reste difficile à établir sans ambiguïté, et a parfois fait l'objet d'erreurs dans la littérature, en particulier à cause de la forte valeur de déplacement chimique du carbone C-27 (δ_C 26,5) inhabituelle pour un carbone en position axiale. La masse de l'ion moléculaire (m/z 473,36 g/mol $[M+H]^+$) correspond à la valeur théorique calculée, et les données de RMN sont en accord avec les données publiées (Wen *et al.*, 2006).

Le processus d'identification de l'acide déhydroarjunolique (**HB-3**) est semblable à celui de l'acide maslinique. La masse de l'ion moléculaire (m/z 487,34 g/mol $[M+H]^+$) correspond à la valeur théorique calculée, et les données de RMN sont en accord avec les données publiées (Mahato et Kundu, 1994).

Le processus d'identification de l'acide arjunolique (**HB-4**) est semblable à celui de l'acide maslinique. La masse de l'ion moléculaire (m/z 489,35 g/mol $[M+H]^+$) correspond à la valeur théorique calculée, et les données de RMN sont en accord avec les données publiées (Facundo *et al.*, 2005).

4.1.3 Etat de l'art relatif aux composés isolés

Les dérivés de la famille des gallotannins (bergénine) et des élagitannins (castacrénines) sont caractérisés par un squelette tricyclique possédant une unité osidique. La bergénine et ses dérivés (norbergénine, tri-*O*-méthylnorbergénine) sont des produits isolés de diverses plantes, comme par exemple *Bergenina purpurasensi* (Xin-Min *et al.*, 1987), *Mallitus japonicus* (Yoshida *et al.*, 1982)

et *Marcaranga peltata* (Ramaiah *et al.*, 1979). Ils constitueraient les principes actifs de plantes utilisées traditionnellement comme antitussifs (Xin-Min *et al.*, 1987), antiulcéreux (Yoshida *et al.*, 1982), antioxydants (De Abreu *et al.*, 2008) et pour le traitement de maladies vénériennes (Ramaiah *et al.*, 1979). Ils possèdent également des activités *in vitro* anti-VIH (Piacente *et al.*, 1996). Enfin, la bergénine montre de bonnes activités sur diverses souches de *Candida* spp, avec des concentrations inhibitrices minimales (CIM) de 4,9 à 9,8 µg/mL (Da Silva *et al.*, 2009).

L'acide maslinique est un composé commun des végétaux supérieurs. Ce composé a été décrit comme possédant des propriétés antifongiques sur des champignons phytopathogènes et comme étant une phytoalexine (El Lahlou *et al.*, 1999). Il possède également des propriétés anticancéreuses (Li *et al.*, 2010 ; Reyes *et al.*, 2006 ; Reyes-Zurita *et al.*, 2009), antioxydantes (Sultana et Nam, 2007), anti-VIH (Parra *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 1996), inhibitrices de la glycogène phosphorylase (Wen *et al.*, 2006) et aussi cytotoxiques (Wang *et al.*, 2006). Ses propriétés anti-inflammatoires (Aladedunye *et al.*, 2008 ; Banno *et al.*, 2005) ont fait l'objet d'un brevet pour une pommade (Kuno et Shinohara, 2003).

L'acide déhydroarjunolique a été isolé pour la première fois de *Terminalia tomentosa* (Combretaceae) et aucune activité biologique ne lui est connue à ce jour (Ramachandra Row et Subba Rao, 1962).

L'acide arjunolique est probablement plus courant encore que l'acide maslinique, et a déjà été isolé de diverses espèces. Il peut être noté que ce composé a montré une activité antifongique avec des valeurs de CIM de 50 µg/mL sur *C. albicans*, *C. krusei* et *Cryptococcus neoformans* (Bisoli *et al.*, 2008) et une activité anti-inflammatoire et anti-cholinestérase (Facundo *et al.*, 2005).

4.1.4 Activités biologiques des composés isolés

Les quatre composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *H. balsamifera* (**HB-1** : bergénine, **HB-2** : acide maslinique, **HB-3** : acide déhydroarjunolique et **HB-4** : acide arjunolique) ont été testés sur 15 souches de champignons pathogènes humains (7 dermatophytes et 8 levures).

Les valeurs de CIM sont indiquées en µg/mL. Les activités cytotoxiques sur la lignée cellulaire KB sont exprimées en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire, pour une concentration de 10⁻⁵M. Sur les lignées cellulaires MDA-MB-435 et MRC5, la CI₅₀ a été déterminée pour une

gamme de concentrations allant de 128,0 à 0,5 µg/mL. Les données sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 Valeurs de CIM (µg/mL), capacités antiprolifératives (%) et CI₅₀ (µg/mL) des composés HB-1, HB-2, HB-3 et HB-4

Souche/lignée cellulaire	Fluconazole	Itraconazole	Docetaxel	HB-1	HB-2	HB-3	HB-4
CIM en µg/mL							
<i>M. canis</i> LMGO 25	2	0,5		> 64	32	> 64	> 64
<i>M. canis</i> LMGO 22	> 64	> 16		> 64	> 64	> 64	> 64
<i>M. gypseum</i> LMGO 10	16	0,25		> 64	8	> 64	> 64
<i>T. rubrum</i> LMGO 08	> 64	> 16		> 64	> 64	> 64	> 64
<i>T. rubrum</i> LMGO 06	2	0,25		> 64	8	> 64	> 64
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	> 64	> 16		> 64	> 64	> 64	> 64
<i>T. rubrum</i> LMGO 4218	32	0,5			8	8	
<i>C. albicans</i> LMGO 102	> 64	> 16		8	64	64	> 64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	0,5		8	32	> 64	> 64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4	0,5		8	32	32	> 64
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	4	0,5		8	64	> 64	> 64
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	8	0,5		32	16	16	> 64
<i>C. tropicalis</i> LMGO 35	1	0,25		4	> 64	> 64	> 64
<i>C. krusei</i> LMGO 174	32	> 16		> 64	32	> 64	> 64
<i>Cryptococcus gattii</i> LMGO L1	2	0,25		> 64	32	> 64	> 64
Activité antiproliférative à 10 ⁻⁵ M (%)							
KB			99		24	0	0
Activité antiproliférative (CI ₅₀ en µg/mL)							
MRC5	> 128	> 128	< 0,25	> 128			
MDA-MB-435	> 128	> 128	< 0,25	> 128			

La meilleure activité antifongique a été observée pour la bergénine (**HB-1**) sur *C. tropicalis* (4 µg/mL), et d'une manière générale la bergénine est le composé le plus actif parmi ceux isolés de *H. balsamifera*, en particulier sur le genre *Candida*. Celle-ci n'a pas présenté d'activité antiproliférative sur les lignées MRC5 et MDA-MB-435 à 128 µg/mL. L'acide maslinique a également présenté quelques bonnes activités antifongiques, sur les champignons dermatophytes en particulier. En relation aux activités antiprolifératives, aucun des autres composés n'a présenté de propriété cytotoxique ou anticancéreuse.

De fait, la bergénine a alors retenu notre attention pour ses activités antifongiques modérées à bonnes, et pour sa non-toxicité même sur la lignée sensible MDA-MB-435. Dans la suite de ces travaux, ce composé a fait l'objet d'études d'associations afin d'observer s'il pouvait agir en synergie avec les agents thérapeutiques antifongiques (Partie 5, p. 133).

4.2 Composés isolés de *Peltogyne* sp.

Il a pu être isolé deux composés à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Peltogyne* sp. : le (+) mopanol (**P-1**) et le (+)-peltogynol (**P-2**). Les structures sont présentées dans la figure 44.

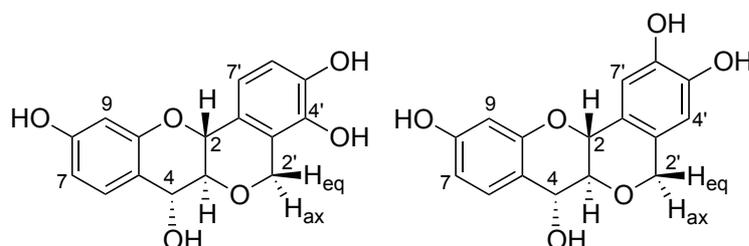


Figure 44 Composés isolés de *Peltogyne* sp.: le (+)-mopanol (P-1) (à g.) et le (+)-peltogynol (P-2) (à d.)

4.2.1 Données relatives au (+)-mopanol (P-1) et au (+)-peltogynol (P-2)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis de confirmer leurs structures sont décrits dans le tableau 9.

Tableau 9 Données de RMN relatives au (+)-mopanol (P-1) et au (+)-peltogynol (P-2)

(+)-mopanol (P-1)		(+)-peltogynol (P-2)		
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
2	4.78 (1H, m superposé)	73.3	4.74 (1H, m superposé)	73.3
3	3.50 (1H, dd, <i>J</i> = 10.0, 9.0)	79.1	3.53 (1H, dd, <i>J</i> = 9.8, 8.4)	79.6
4	4.76 (1H, m superposé)	70.6	4.76 (1H, m superposé)	70.6
5		117.6		117.7
6	7.31 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 1.0)	130.1	7.31 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 1.0)	130.1
7	6.46 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.4)	110.3	6.46 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.4)	110.4
8		159.2		157.2
9	6.32 (1H, d l, <i>J</i> = 2.4)	103.6	6.32 (1H, d l, <i>J</i> = 2.4)	103.6
10		156.5		154.9
2'	ax : 5.00 (1H, d, <i>J</i> = 15.5) éq : 4.76 (1H, m superposé)	66.2	4.74-4.83 (2H, m superposé)	66.2
3'		123.6		125.8
4'		145.2	6.48 (1H, s l)	111.7
5'		141.5		145.7
6'	6.78 (1H, d, <i>J</i> = 8.2)	114.9		146.6
7'	6.98 (1H, d, <i>J</i> = 8.2)	118.1	7.03 (1H, s l)	113.7
8'		125.6		123.5

Concernant le (+)-mopanol, les signaux à δ_H 7,31 ppm (1H, dd, $J = 8,4, 1,0$, H-6), 6,46 ppm (1H, dd, $J = 8,4, 2,4$, H-7) et 6,32 ppm (1H, d, $J = 2,4$, H-9) sont caractéristiques d'un cycle aromatique trisubstitué, alors que ceux à 6,78 ppm (1H, d, $J = 8,2$, H-6') et 6,98 ppm (1H, d, $J = 8,2$, H-7') sont caractéristiques d'un cycle aromatique tétrasubstitué. Les corrélations HMBC H2→C3', C3, C4, C8'; H3→C2, C2', C4 ; C8' ; H4→ C2, C5, C6, C7, C10 et H2'→ C2, C3, C4', C8' permettent de construire un squelette du type flavan-3,4-diol. Les corrélations NOESY H2→H4 et H3→ H2'_{ax} indiquent que les protons H-2, H-3 et H-4 occupent tous une position axiale. La masse de l'ion moléculaire (m/z 303,08 g/mol $[M+H]^+$) est en accord avec la valeur calculée. La forte valeur positive du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} +181,36$ (MeOH, c 0,12), ainsi que les données de RMN ont permis de confirmer la structure et d'établir la configuration absolue du (+)-mopanol par comparaison avec la littérature (Ahmad-Junan et Whiting, 1990 ; Drewes et Roux, 1965).

Le processus d'identification du (+)-peltogynol est semblable à celui du (+)-mopanol, et les données spectrales sont en accord avec celles décrites dans la littérature (Ahmad-Junan et Whiting, 1990).

4.2.2 Etat de l'art relatif aux composés isolés

Le (+)-mopanol et le (+)-peltogynol avaient déjà été isolés d'espèces appartenant au genre *Peltogyne* (De Almeida *et al.*, 1974 ; Malan et Roux, 1974). Ces molécules structurellement proches se retrouvent chez *Colophospermum mopane* (Leguminosae - Caesalpinioideae) (Ferreira *et al.*, 2003) et *Lysidice rhodostegia* (Leguminosae - Caesalpinioideae). Les activités biologiques de ces composés sont peu connues, pourtant, le (+)-mopanol semble posséder des propriétés vasodilatatrices (Gao *et al.*, 2004).

4.2.3 Activités biologiques des composés isolés

Des deux composés isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Peltogyne* sp. seul le (+)-mopanol a pu être testé sur 14 souches de champignons (6 dermatophytes et 8 levures), le (+)-peltogynol ayant été obtenu en quantité insuffisante.

Les valeurs de CIM sont indiquées en $\mu\text{g/mL}$. Sur les lignées cellulaires MDA-MB-435 et MRC5, la CI_{50} a été déterminée pour une gamme de concentrations allant de 128,0 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Les données sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 Valeurs de CIM ($\mu\text{g/mL}$) et capacités antiprolifératives (CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$) du (+)-mopanol

Souche/lignée cellulaire	Fluconazole	Itraconazole	Docetaxel	(+)-mopanol
CIM en $\mu\text{g/mL}$				
<i>M. canis</i> LMGO 25	2	0,5		32
<i>M. canis</i> LMGO 22	> 64	> 16		64
<i>M. gypseum</i> LMGO 10	16	0,25		64
<i>T. rubrum</i> LMGO 08	> 64	> 16		> 64
<i>T. rubrum</i> LMGO 06	2	0,25		16
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	> 64	32		64
<hr/>				
<i>C. albicans</i> LMGO 102	> 64	> 16		0,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	0,5		2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4	0,5		1
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	4	0,5		1
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	8	0,5		32
<i>C. tropicalis</i> LMGO 35	1	0,25		4
<i>C. krusei</i> LMGO 174	> 64	16		1
<i>Cryptococcus gattii</i> LMGO L1	2	0,25		> 64
<hr/>				
Activité antiproliférative (CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$)				
MRC5	>128	>128	< 0,25	>128
MDA-MB-435	>128	>128	< 0,25	20,0

Le (+)-mopanol a montré de fortes activités antifongiques sur les levures, avec des valeurs de CIM proches de celles des contrôles positifs. Il est intéressant de relever en particulier la valeur de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ obtenue sur *C. albicans* LMGO 102, souche résistante à l'itraconazole et au fluconazole, et en général le mopanol possède une très bonne activité sur les espèces *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. Toutefois, ce composé semble peu ou pas actif sur *C. glabrata* LMGO 44 et *Cryptococcus gatti* LMGO L1.

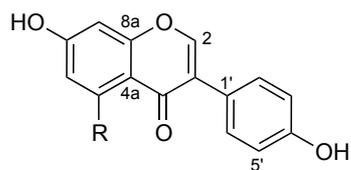
En outre, le (+)-mopanol n'a pas montré de capacités antiprolifératives notables sur la lignée cellulaire MRC5, mais possède toutefois une certaine toxicité envers la lignée MDA-MB-435 avec une CI_{50} de 20,0 $\mu\text{g/mL}$, soit une valeur d'indice de sélectivité de 20 sur *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* LMGO 05 et *C. krusei* LMGO 174. Sur la souche *C. albicans* LMGO 102, résistante aux agents thérapeutiques, l'indice de sélectivité est de 40. A ce niveau de l'étude, nous pouvons conclure que le (+)-mopanol possède des capacités antifongiques prononcées, avec une spécificité d'action néanmoins inférieure à celle de l'itraconazole.

4.3 Composés isolés de *Spirotropis longifolia*

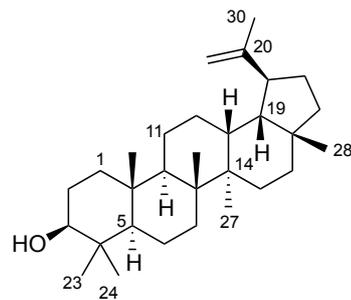
Le genre *Spirotropis*, dont l'espèce *longifolia* est l'unique représentante, n'a jamais été étudié d'un point de vue chimique. Ainsi, il a été décidé de conduire une investigation phytochimique de

cette plante afin d'établir un profil chimiotaxonomique, ce qui pouvait conduire à l'isolement de composés nouveaux.

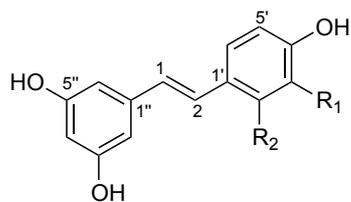
Il a pu être isolé 14 molécules de l'espèce *Spirotropis longifolia*. De l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines, 6 composés ont été isolés : la daidzéine (**SP-1**), la génistéine (**SP-2**), l'isoprunétine (**SP-3**), le lupéol (**SP-4**), le picéatannol (**SP-5**) et le *trans*-resvératrol (**SP-6**) ; de l'extrait à l'acétate d'éthyle de racines adventives, il a pu être isolé 8 molécules : la gnétine D (**SP-7**), la gnétine E (**SP-8**), le latifolol (**SP-9**), le *trans*-oxyresvératrol (**SP-10**), et 4 molécules inédites dénommées spirotropone (**SP-11**), spirotropine A (**SP-12**), spirotropine B (**SP-13**) et spirotropine C (**SP-14**) (Figure 45).



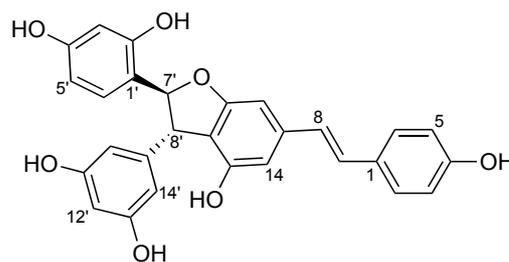
- SP-1** R = H : Daidzéine
SP-2 R = OH : Génistéine
SP-3 R = OMe : Isoprunéine



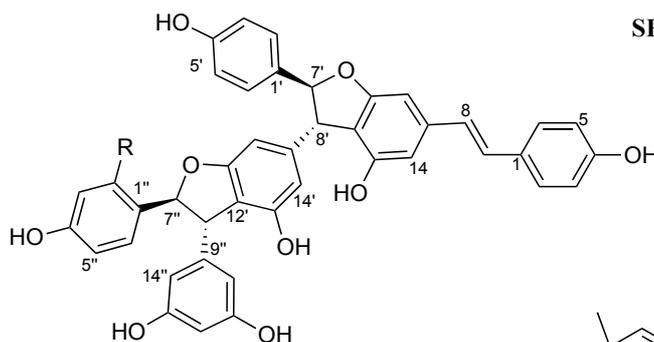
SP-4 : Lupéol



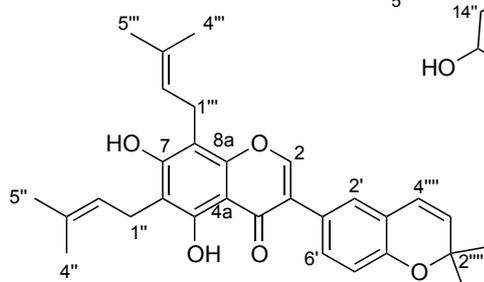
- SP-5** R₁ = OH ; R₂ = H : Picéatannol
SP-6 R₁ = R₂ = H : *trans*-Resvératrol
SP-10 R₁ = H ; R₂ = OH : *trans*-Oxyresvératrol



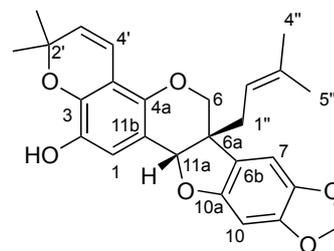
SP-7 : Gnétine D



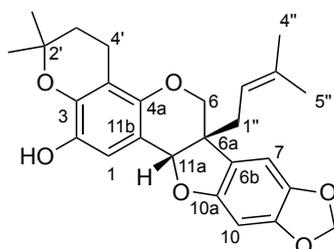
- SP-8** R = H : Gnétine E
SP-9 R = OH : Latifolol



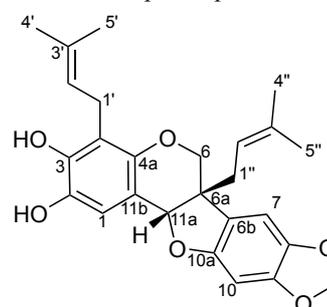
SP-11 : Spirotropone



SP-12 : Spirotropine A



SP-13 : Spirotropine B



SP-14 : Spirotropine C

Figure 45 Molécules isolées de *Spirotropis longifolia*

4.3.1 Données relatives à la daidzéine (SP-1), la génistéine (SP-2) et à l'isoprunétine (SP-3)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis de confirmer leurs structures sont décrits dans le tableau 11.

Ces trois molécules sont des isoflavonoïdes, dont le squelette est facilement identifiable par l'enchaînement des atomes de carbone C2 (~153 ppm), C3 (~125 ppm), C4 (~179 ppm), C4a (~110 ppm), C8a (~160 ppm) et les corrélations HMBC H2→C1' et H2'→C3. Les positions relatives des groupements hydroxyles et la nature du substituant en position 5 sont déterminées par l'observation des déplacements chimiques des atomes de carbone aromatique et des corrélations proton – carbone à longue distance (HMBC). La masse des ions moléculaires – daidzéine : m/z 255,06 g/mol [M+H]⁺, génistéine : m/z 271,06 g/mol [M+H]⁺ et isoprunétine : m/z 285,07 g/mol [M+H]⁺ – correspondent aux structures proposées et les données de RMN sont comparables à celles décrites dans la littérature (Kozerski *et al.*, 2003 ; Kulesh *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009).

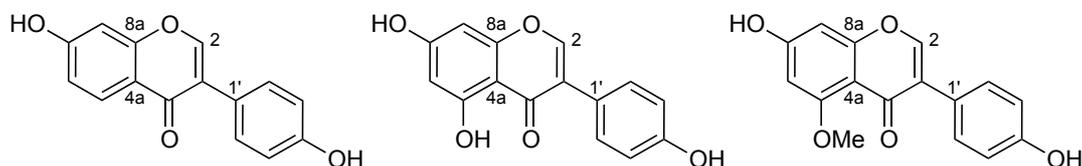


Figure 46 Structures de la daidzéine (SP-1, à g.), la génistéine (SP-2, milieu) et l'isoprunétine (SP-3, à d.)

Tableau 11 Données de RMN relatives à la daidzéine (SP-1), la génistéine (SP-2) et l'isoprunétine (SP-3)

	Daidzéine		Génistéine		Isoprunétine	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
2	8.10 (1H, s)	154	8.06 (1H, s)	153.0	7.94 (1H, s)	151.0
3		125.8		123.5		126.6
4		178		180.9		177.2
4a		117.4		105.0		108.7
5	8.01 (1H, d, <i>J</i> = 9.0)	128		162.4		162.4
6	6.89 (1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.4)	117	6.22 (1H, s l)	99.0	6.42 (1H, s l)	97.0
7		162.1		164.3		164.3
8	6.77 (s, d, <i>J</i> = 2.4)	103.4	6.34 (1H, s l)	93.8	6.42 (1H, s l)	95.6
8a		160		158.4		160.8
1'		124.4		122.0		124.0
2'/5'	7.36 (2H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.2)	131.2	7.37 (2H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.7)	130.0	7.32 (2H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.7)	130.6
3'/6'	6.84 (2H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.2)	115.9	6.84 (2H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.7)	115.3	6.82 (2hH, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.7)	115.6
4'		158.6		157.4		157.7
O-Me					3.88 (3H, s)	55.8

4.3.2 Données relatives au lupéol (SP-4)

Le spectre de RMN de ce composé a été réalisé dans le CDCl₃ et les éléments de RMN ayant permis d'établir sa structure sont décrits dans le tableau 12.

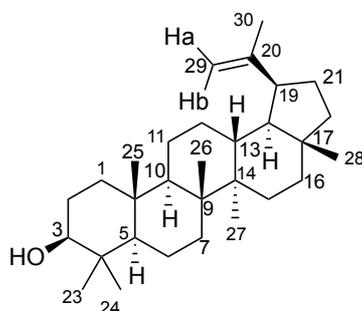


Figure 47 Structure du lupéol (SP-4)

Tableau 12 Données de RMN relatives au lupéol

		¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C)
1	a	1.68 (1H, m)	38.7	H1b, H2	C2, C10
	b	0.91 (1H, m)			
2	a	1.61 (1H, m)	27.5	H1, H2b	C1, C3
	b	1.54 (1H, m)			
3		3.18 (1H, dd, <i>J</i> = 11.1, 5.2)	79.0	H2	C2, C4
4			38.9		
5		0.69 (1H, d, <i>J</i> = 9.2)	55.3	H6	C4, C6, C10
6	a	1.54 (1H, m)	18.3	H5, H6b, H7	C5, C7
	b	1.39 (1H, m)			
7		1.41 (2H, m)	33.3	H6	C6, C8
8			40.8		
9		1.25 (1H, m)	50.5	H11	C8, C10, C11
10			37.2		
11	a	1.42 (1H, m)	21.0	H9, H11b	C9, C12
	b	1.25 (1H, m)			
12	a	1.68 (1H, m)	29.7	H11, H13	C11, C13
	b	1.07 (1H, m)			
13		1.66 (1H, m)	38.1	H12, H18	C12, C14, C18
14			42.8		
15	a	1.71 (1H, m)	27.4	H15b, H16	C14, C16
	b	1.01 (1H, m)			
16	a	1.49 (1H, m)	35.6	H15, H16b	C15, C17
	b	1.38 (1H, m)			
17			43.0		
18		1.36 (1H, m)	48.7	H13, H19	C13, C17, C19
19		2.37 (1H, ddd, <i>J</i> = 11.0, 11.0, 5.9)	48.0	H18, H21	C18, C20, C21, C30
20			151.0		
21	a	1.91 (1H, m)	29.9	H20, H21b, H22	C20, C22
	b	1.32 (1H, m)			

22	a	1.37 (1H, m)	40.0	H21, H22b	C17, C21
	b	1.19 (1H, m)		H21, H22a	
23		0.76 (3H, s)	15.4		C3, C4, C5, C24
24		0.96 (3H, s)	28.0		C3, C4, C5, C23
25		0.83 (3H, s)	16.1		C1, C5, C9, C10
26		1.03 (3H, s)	16.0		C7, C8, C9, C14
27		0.94 (3H, s)	14.5		C8, C13, C14, C15
28		0.79	18.0		C16, C17, C18, C22
29	a	4.56 (1H, m)	109.3	H29b, H30	C19, C20, C30
	b	4.68 (1H, d 1, $J = 2.5$)		H29a, H30	C19, C20, C30
30		1.69 (3H, 3)	19.3	H29a, H29b, H19	C19, C20, C29

De la même manière qu'ont été identifiés les triterpènes issus de *H. balsamifera*, il peut être observé la présence de 30 carbones, dont 6 groupes méthyle et une double liaison exocyclique (C-20 à δ_C 151,0 et C-29 à δ_C 109,3). Ces données montrent la présence d'un composé avec un squelette lupénique, identifié par la suite comme étant le lupéol. La masse de l'ion moléculaire (m/z 427,39 g/mol $[M+H]^+$) est compatible avec la structure proposée, et les données de RMN correspondent à celles décrites dans la littérature (Fotie *et al.*, 2006).

4.3.3 Données relatives au picéatannol (SP-5), *trans*-resvératrol (SP-6) et *trans*-oxyresvératrol (SP-10)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis de confirmer leurs structures sont décrits dans le tableau 13.

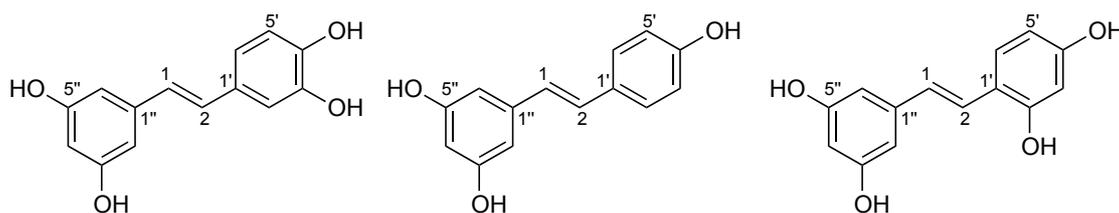


Figure 48 Structures du picéatannol (SP-5, à g.), *trans*-resvératrol (SP-6, milieu) et *trans*-oxyresvératrol (SP-10, à d.)

Tableau 13 Données de RMN relatives au picéatannol (SP-5), au *trans*-resvératrol (SP-6) et au *trans*-oxyresvératrol (SP-10)

	Picéatannol		<i>trans</i>-Resvératrol		<i>trans</i>-Oxyresvératrol	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)
1	6.88 (1H, d, <i>J</i> = 16.0)	129.7	6.95 (1H, d, <i>J</i> = 16.0)	129.0	7,27 (1H, d, <i>J</i> = 16.4)	127.4
2	6.73 (1H, d, <i>J</i> = 16.0)	126.8	6.78 (1H, d, <i>J</i> = 16.0)	126.7	6.83 (1H, d, <i>J</i> = 16.4)	125.6
1'		131.0		130.0		116.7
2'	6.97 (1H, d, 1.9)	113.0	7.34 (1H, d l, <i>J</i> = 8.4)	128.5		157.2
3'		146.0	6.75 (1H, d l, <i>J</i> = 8.8)	116.2	6.33 (1H, m)	103.5
4'		146.0		157.6		159.1
5'	6.74 (1H, d, <i>J</i> = 8.2)	116.3	6.75 (1H, d l, <i>J</i> = 8.8)	116.2	6.33 (1H, m)	108.4
6'	6.83 (1H, dd, <i>J</i> = 8.2, 1.9)	120.7	7.34 (1H, d l, <i>J</i> = 8.4)	128.5	7.33 (1H, d l, <i>J</i> = 9.1)	124.5
1''		141.0		141.0		141.3
2''/6''	6.43 (2H, d, <i>J</i> = 2.0)	105.6	6.40 (2H, d, <i>J</i> = 2.5)	105.5	6.47 (2H, d, <i>J</i> = 2.0)	104.7
3''/5''		159.2		159.2		159.8
4''	6.15 (1H, t, <i>J</i> = 2.0)	102.5	6.20 (1H, t, <i>J</i> = 2.0)	102.6	6.16 (1H, t, <i>J</i> = 2.1)	102.8

En ce qui concerne le picéatannol, il a pu être observé deux signaux à δ_H 6,88 ppm (1H, d, $J = 16,0$, H-1) et 6,73 ppm (1H, d, $J = 16,0$, H-2) relatifs à une double liaison 1,2-disubstituée de configuration *trans*. Les signaux à δ_H 6,43 ppm (2H, d, $J = 2,0$, H-2''), 6,15 ppm (1H, t, $J = 2,0$, H-4'') et 6,43 ppm (2H, d, $J = 2,5$, H-6'') indiquent la présence d'un cycle aromatique 1,3,5-trisubstitué ; alors que les signaux à δ_H 6,97 ppm (1H, d, $J = 1,9$, H-2'), 6,74 ppm (1H, d, $J = 8,2$, H-5') et 6,83 ppm (1H, dd, $J = 1,9$, $J = 8,2$, H-6') ont permis de construire un autre cycle aromatique 1,3,4-trisubstitué. Les déplacements chimiques des atomes de carbone quaternaires C-3', C-4', C-3'' et C-5'' indiquent qu'ils portent des groupements hydroxyles. Les corrélations HMBC H1 \rightarrow C1'', C2, C2', C6' et H2 \rightarrow C1, C1', C1'', C2'', C6'' ont permis de construire une structure de type stilbène, et plus précisément le picéatannol.

Les structures des autres composés stilbéniques ont été déduites par le même processus d'identification ; les valeurs de masse des ions moléculaires – picéatannol : m/z 245,08 g/mol $[M+H]^+$, *trans*-resvératrol : m/z 229,08 g/mol $[M+H]^+$ (Yamada *et al.*, 2004) et *trans*-oxyresvératrol : m/z 245,08 g/mol $[M+H]^+$ – correspondent aux structures proposées et les données de RMN sont comparables à celles décrites dans la littérature (Kanchanapoom *et al.*, 2002 ; Yamada *et al.*, 2004 ; Young Han *et al.*, 2009).

4.3.4 Données relatives à la gnétine D (SP-7)

Le spectre de RMN de ce composé a été réalisé dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis d'établir sa structure sont décrits dans le tableau 14.

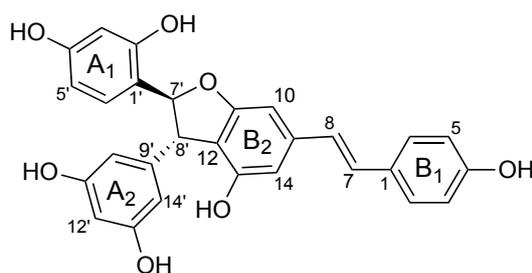


Figure 49 Structure de la gnétine D (SP-7)

Tableau 14 Données de RMN relatives à la gnétine D (SP-7)

	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C)	NOESY
1		130.2			
2/6	7.37 (2H, d l, J = 8.8)	128.5	H3	C3, C4, C6, C7	H3, H7
3/5	6.77 (2H, d l, J = 8.4)	116.2	H2	C1, C2, C4, C5	H2
4		158.1			
7	7.01 (1H, d, J = 16.2)	128.9	H8	C2, C6, C8, C9	H2, H6
8	6.88 (1H, d, J = 16.2)	126.8	H7	C1, C7, C9, C10, C14	H10, H14
9		141.0			
10	6.64 (1H, s l)	99.3		C8, C11, C12, C14	H8
11		163.0			
12		115.8			
13		155.5			
14	6.49 (1H, s l)	107.6		C8, C10, C12, C13	H8
1'		120.6			
2'		156.6			
3'	6.33 (1H, d, J = 2.4)	103.2	H5'	C1', C5'	
4'		158.9			
5'	6.22 (1H, dd, J = 8.0, 2.4)	106.9	H6', H3'	C1', C3'	H6'
6'	6.96 (1H, d, J = 8.0)	127.9	H5'	C2', C4', C5, C7'	H5', H7', H8'
7'	5.65 (1H, d, J = 4.0)	89.8	H8'	C1', C2', C6', C8', C9', C11	H6', H10', H14'
8'	4.39 (1H, d, J = 4.0)	54.4	H7'	C1', C7', C9', C10', C11, C12, C13, C14'	H6', H10', H14'
9'		147.0			
10'/14'	6.20 (2H, d, J = 2.2)	107.0	H12', H14'	C8', C12', C14'	H8', H7'
11'/13'		159.0			
12'	6.12 (1H, t, J = 2.2)	101.5	H10', H14'		

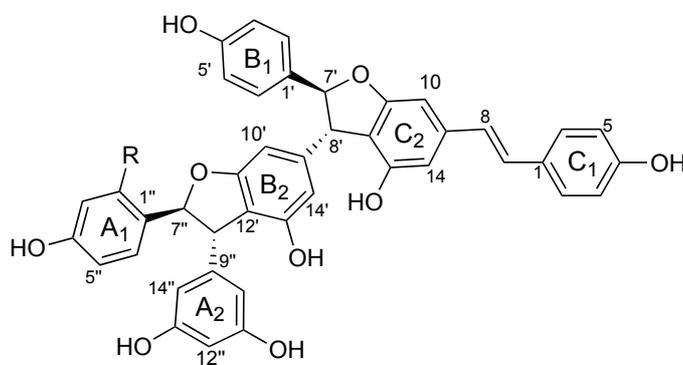
Le spectre de RMN du proton de ce composé présente un système de protons couplés *ortho* AA'XX' provenant d'un cycle aromatique disubstitué *para* à δ_H 7,37 ppm (2H, d l, J = 8,8, H-6), 6,77 ppm (2H, d l, J = 8,4, H-3 et H-5). On observe également un système de protons couplés *mé*ta A₂X issu d'un cycle aromatique 1,3,5-trisubstitué à δ_H 6,20 ppm (1H, d, J = 2,2, H-10') et 6,12 ppm (1H, t, J = 2,2, H-12'). Il a également été possible d'identifier un système de protons AMX issus d'un motif phényle 1,4,6-trisubstitué à δ_H 6,33 ppm (1H, d, J = 2,4, H-3'), 6,22 ppm (1H, dd, J = 8,0, 2,4, H-5'), 6,96 ppm (1H, d, J = 8,0, H-6'), et enfin un système de protons couplés *mé*ta provenant d'un motif phényle 1,3,4,5-tétrasubstitué à δ_H 6,64 ppm (1H, s l, H-10) et 6,49 ppm (1H, s l, H-14).

La connexion des unités A₁, A₂, B₁, B₂ notées sur la figure 49 se fait selon le même raisonnement que pour la gnétine E décrite ci-après ; on peut alors dessiner la structure de la gnétine

D. La valeur positive du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{29} +5,84$ (MeOH, c 0,15), la masse de l'ion moléculaire (m/z 471,14 g/mol $[M+H]^+$), ainsi que les données de RMN ont permis d'établir la structure et la configuration absolue de la gnétine D par comparaison avec la littérature (Lins *et al.*, 1982b).

4.3.5 Données relatives à la gnétine E (SP-8) et au latifolol (SP-9)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD_3OD et les éléments de RMN ayant permis d'établir leurs structures sont décrits dans le tableau 15.



SP-8 R = H : Gnétine E
 SP-9 R = OH : Latifolol

Figure 50 Structure de la gnétine E (SP-8) et du latifolol (SP-9)

Tableau 15 Données de RMN relatives à la gnétine E (SP-8) et au latifolol (SP-9)

	Gnétine E					Latifolol				
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C)	NOESY	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C)	NOESY
1		130.5					130.2			
2/6	7.38 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)	128.8	H3	C3, C4, C6, C7,	H3, H7	7.38 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)	128.4	H3	C3, C4, C6, C7,	H3, H7
3/5	6.78 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)	116.3	H2	C1, C2, C4, C5	H2	6.77 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)	116.2	H2	C1, C2, C4, C5	H2
4		158.4					158.4			
7	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 16.2)	129.5	H8	C2, C6, C8, C9	H2, H6	7.00 (1H, d, <i>J</i> = 16.2)	129.1	H8	C2, C6, C8, C9	H2, H6
8	6.90 (1H, d, <i>J</i> = 16.2)	127.1	H7	C1, C7, C9, C10, C14	H10, H14	6.90 (1H, d, <i>J</i> = 16.2)	126.7	H7	C1, C7, C9, C10, C14	H10, H14
9		141.9					141.9			
10	6.64 (1H, s l)	99.6		C8, C11, C12, C14	H8	6.64 (1H, s l)	100.0		C8, C11, C12, C14	H8
11		163.5					163.2			
12		115.5					115.52			
13		155.8					155.2			
14	6.54 (1H, s l)	108.2		C8, C10, C12, C13	H8	6.54 (1H, s l)	107.0		C8, C10, C12, C13	H8
1'		134.5					134.2			
2'/6'	7.19 (2H, d, <i>J</i> = 8.4)	128.1	H3'	C3', C4', C6', C7'	H3', H7', H8'	7.19 (2H, d, <i>J</i> = 8.4)	127.7	H3'	C3', C4', C6', C7'	H3', H7', H8'
3'/5'	6.78 (2H, d, <i>J</i> = 8.4)	116.0	H2'	C1', C2', C4', C5'	H2'	6.79 (2H, d, <i>J</i> = 8.4)	116.2	H2'	C1', C2', C4', C5'	H2'
4'		158.6					158.4			
7'	5.40 (1H, d, <i>J</i> = 4.9)	94.6	H8'	C1', C2', C6', C8', C9', C11	H2', H6', H10', H14'	5.39 (1H, d, <i>J</i> = 4.9)	94.3	H8'	C1', C2', C6', C8', C9', C11	H2', H6', H10', H14'
8'	4.42 (1H, d, <i>J</i> = 4.9)	56.7	H7'	C1', C7', C9', C10', C11, C12, C13, C14'	H10', H14', H2', H6'	4.42 (1H, d, <i>J</i> = 4.9)	56.4	H7'	C1', C7', C9', C10', C11, C12, C13, C14'	H2', H6', H10', H14'
9'		147.1					146.4			
10'	6.23 (1H, s l)	101.1		C8', C11', C12', C14'	H7', H8'	6.23 (1H, s l)	100.9		C8', C11', C12', C14'	H7', H8'
11'		163.3					163.0			

12'		114.5					115.0			
13'		155.8					155.3			
14'	6.20 (1H, s l)	108.7		C8', C10', C12', C13'	H7', H8'	6.18 (1H, s l)	108.0		C8', C10', C12', C13'	H7', H8'
1''		134.2					120.5			
2''	7.14 (2H, d, <i>J</i> (/6'' *) = 8.6)	128.2	H3''	C3'', C4'', C6'', C7''	H3'', H7'', H8''		156.6			
3''	6.78 (2H, d, <i>J</i> (/5''**) = 8.6)	116.0	H2''	C2'', C1'', C4'', C5''	H2''	6.31 (1H, d, <i>J</i> = 2.2)	103.1	H6''	C1'', C3''	
4''		158.5					158.9			
5''	cf. 3''					6.22 (1H, dd, <i>J</i> = 8.6, 2.2)	107.0	H2''	C4'', C1''	H2''
6''	cf. 2''					6.95 (1H, d, <i>J</i> = 8.2)	128.1	H3''	C6'', C3''	H3'', H7'', H8''
7''	5.29 (1H, d, <i>J</i> = 5.9)	94.8	H8''	C1'', C2'', C6'', C8'', C9'', C11'	H2'', H6'', H10'', H14''	5.64 (1H, d, <i>J</i> = 4.3)	89.2	H8''	C1'', C2'', C6'', C8'', C9'', C11'	H2'', H10'', H14''
8''	4.33 (1H, d, <i>J</i> = 5.9)	56.7	H7''	C1'', C7'', C9'', C10'', C11', C12', C13', C14''	H2'', H6'', H10'', H14''	4.39 (1H, d, <i>J</i> = 4.3)	54.3	H7''	C1'', C7'', C9'', C10'', C11', C12', C13', C14''	H2'', H10'', H14''
9''		146.6					147.0			
10''/14''	6.11 (2H, s l)	107.1		C8'', C12'', C14''	H7'', H8''	6.19 (2H, s l)	108.4		C8'', C12'', C14''	H7'', H8''
11''/13''		159.6					159.0			
12''	6.13 (1H, s l)	102.2		C10'', C14''		6.11 (1H, s l)	101.6		C10'', C14''	

* 2''/6'' pour ces protons qui sont équivalents chez la gnétine E

** 3''/5'' pour ces protons qui sont équivalents chez la gnétine E

En abordant en premier lieu le spectre de RMN du proton de la gnétine E, on observe trois systèmes de protons *ortho*-couplés AA'XX' provenant de cycles aromatiques substitués en *para* (A₁, B₁, C₁) à δ_{H} 7,14 ppm (2H, d, $J = 8,6$, H-2''/6'') et 6,78 ppm (2H, d, $J = 8,6$, H-3''/H-5''), 7,19 ppm (2H, d, $J = 8,4$, H-2'/H-6') et 6,78 ppm (2H, d, $J = 8,4$, H-3'/H-5') puis 7,38 ppm (2H, d, $J = 8,6$, H-2/H-6), 6,78 ppm (2H, d, $J = 8,6$, H-3/H-5). Egalement on remarque deux systèmes de protons aromatiques couplés en *mé*ta AX provenant de noyaux benzéniques 1,3,4,5-tétrasubstitués (B₂, C₂) à δ_{H} 6,23 ppm (1H, s l, H-10'), 6,20 ppm (1H, s l, H-14') et 6,64 ppm (1H, s l, H-10), 6,54 (1H, s l, H-14). Il est également possible d'identifier un système de protons couplés *mé*ta A₂X issu d'un cycle aromatique 1,3,5-trisubstitué (A₂) à δ_{H} 6,11 ppm (2H, s l, H-10''/H-14''), 6,13 ppm (1H, s l, H-13''). On observe de plus la présence de 2 protons oléfiniques couplés *trans* à δ_{H} 7,00 ppm (1H, d, $J = 16,2$, H-7) et 6,90 (1H, d, $J = 16,2$, H-8), et enfin deux systèmes de couples de protons méthyne à δ_{H} 5,39 ppm (1H, d, $J = 4,9$, H-7'), 4,42 ppm (1H, d, $J = 4,9$, H-8') et 5,64 ppm (1H, d, $J = 4,3$, H-7''), 4,39 (1H, d, $J = 4,3$, H-8'').

Les couplages HMBC H7→ C2, C6, C8, C9 et H8→ C1', C7', C9', C10', C11, C12, C13, C14' révèlent par la suite la connexion des unités C₁ et C₂ via le système *trans*-oléfinique, de même que les couplages HMBC H7'→ C1', C2', C6', C8', C9' et H8'→ C1', C7', C9', C10', C14' montrent la connexion des unités B₁ et B₂, et les couplages HMBC H7''→ C1'', C2'', C6'', C8'', C9'' et H8''→ C1'', C7'', C9'', C10'', C12', C14'' montrent la connexion des unités A₁ et A₂.

Les déplacements chimiques des systèmes des atomes de carbones C-7' (δ_{C} 94,6), C-8' (δ_{C} 56,7), C-7'' (δ_{C} 94,8) et C-8'' (δ_{C} 56,7) et les couplages HMBC H8'→C11, C12, C13 et H8''→C11', C12'', C13'' indiquent que les motifs A et B comportent chacun un anneau dihydrofurane (C-7', C-8', C-12, C-11, O et C-7'', C-8'', C-12', C-11', O) accolé au groupe phényle 1,3,4,5-tétrasubstitué de l'unité voisine. La valeur négative du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}}^{29} - 7,92$ (MeOH, c 0,11), la valeur de la masse de l'ion moléculaire (m/z 682,21 g/mol [M+H]⁺), ainsi que les données de RMN ont permis de confirmer la structure proposée et d'établir la configuration absolue de la gnétine E par comparaison avec la littérature (Boralle *et al.*, 1993).

Le raisonnement pour l'identification structurale du latifolol est le même que pour la gnétine E, à la différence que cette fois nous n'avons pas trois systèmes de protons *ortho*-couplés A₂B₂ provenant de motifs phényles substitués en *para*, mais deux plus un système de protons AMX issus d'un motif benzénique trisubstitué (A₁) à δ_{H} 6,31 ppm (1H, d, $J = 2,2$, H-3''), 6,22 ppm (1H, dd, $J = 8,6, 2,2$, H-5'') et 6,95 (1H, d, $J = 8,2$, H-6''). La valeur négative du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}}^{29} - 5,68$ (MeOH, c 0,05), la valeur de la masse de l'ion moléculaire (m/z 697,20 g/mol [M+H]⁺), ainsi

que les données de RMN ont permis de confirmer la structure et d'établir la configuration absolue du latifolol par comparaison avec la littérature (Boralle *et al.*, 1993).

4.3.6 Données relatives à la spirotropone (SP-11)

Le spectre de RMN de ce composé a été réalisé dans le CDCl₃ et les éléments de RMN ayant permis d'établir sa structure sont décrits dans le tableau 16.

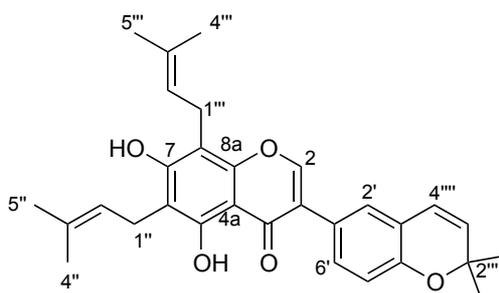


Figure 51 Structure de la spirotropone (SP-11)

Tableau 16 Données de RMN relatives à la spirotropone (SP-11)

	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C)
2	7.90 (1H, s)	152.2		C1', C3, C8a
3		122.9		
4		181.0		
4a		109.0		
5		157.4		
6		105.4		
7		159.5		
8		110.0		
8a		153.2		
1'		123.2		
2'	7.18 (1H, d, <i>J</i> = 2.2)	126.6	H6'	C3, C3', C4', C4''', C6'
3'		121.8		
4'		152.9		
5'	6.83 (1H, d, <i>J</i> = 8.4)	116.5	H6'	C1', C3', C4'
6'	7.23 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.2)	129.3	H2', H5'	C2', C3, C4'
1''	3.48 (1H, d, <i>J</i> = 6.2)	21.5	H2''	C2'', C3'', C4'', C5, C5'', C6, C7
2''	5.27 (1H, t1, <i>J</i> = 7.1)	121.1	H1'', H4'', H5''	C1'', 4'', C5''
3''		135.4		
4''	1.77 (3H, s l)	25.7	H2''	C2'', C3'', C5''
5''	1.84 (3H, s l)	17.7	H2''	C2'', C3'', C4''
1'''	3.46 (1H, d l, <i>J</i> = 6.2)	21.5	H2'''	C2''', C3''', C4''', C7, C8, C8a
2'''	5.23 (1H, t1, <i>J</i> = 7.3)	121.3	H1''', H4''', H5'''	C1''', C4''', C5'''
3'''		134.4		

4''''	1.74 (3H, s l)	25.7	H2''''	C2'''' , C3'''' , C5''''
5''''	1.83 (3H, s l)	17.7	H2''''	C2'''' , C3'''' , C5''''
2''''		76.0		
2''''-CH ₃	1.45 (6H, s)	28.0		2''''-CH ₃ , C2'''' , C3''''
3''''	5.63 (1H, d, <i>J</i> = 9.8)	130.0	H4''''	2''''-CH ₃ , C2'''' , C3''''
4''''	6.35 (1H, d, <i>J</i> = 9.8)	122.1	H3''''	C2'''' , C3'''' , C4''''
OH-5	13.20 (1H, s)			C4, C5, C6
OH-7	6.33 (1H, s)			C6, C7, C8

Le composé **SP-11** a été isolé sous la forme d'un solide jaune pâle. Sa formule moléculaire a été déterminée comme étant C₃₀H₃₂O₅ par l'analyse du spectre HR-ESI-MS (*m/z* 473,2323 [M+H]⁺). Dans un premier temps, le spectre de RMN du proton montre des signaux à δ_H 7,18 (1H, d, *J* = 2,15, H-2'), 7,23 (H, dd, *J* = 8,4, 2,15, H-6'), 6,83 (1H, d, *J* = 8,4, H-5') indiquant la présence d'un cycle aromatique 1,2,4-trisubstitué, alors que les signaux à δ_H 1,45 (6H, s, 2''''-CH₃), 5,63 (1H, d, *J* = 9,8, H-3''''), et 6,35 (1H, d, *J* = 9,8, H-4''''') dans le spectre ¹H sont caractéristiques d'un anneau 2,2-diméthyl-2*H*-pyrane. Les corrélations HMBC de H-4'''' (δ_H 6,35) avec C-3' (δ_C 121,8) et C-4' (δ_C 152,9), ainsi que les déplacements chimiques de C-4' (δ_C 152,9) et C-2'''' (δ_C 76,0) montrent que cet anneau 2,2-diméthyl-2*H*-pyrane est fusionné en position C-3' et C-4' du cycle aromatique 1,2,4-trisubstitué cité précédemment pour former alors un motif 2,2-diméthylchromène substitué en C-1' (δ_C 123,2).

Ensuite, le signal de RMN ¹H à δ_H 7.90 (1H, s, H-2), porté par l'atome de carbone à δ_C 152,2 et corrélé en HMBC à C-8a (δ_C 153,2), C-3 (δ_C 122,9) est classique d'un composé carbonyle α,β-insaturé lié à un noyau aromatique, que l'on retrouve souvent chez les isoflavones. De plus, les corrélations HMBC de H-2 (δ_H 7,90) avec C-1' (δ_C 123,2), de H-2' (δ_H 7,18) avec C-3 (δ_C 122,9) et de H-6' (δ_H 7,23) avec C-3 (δ_C 122,9) nous indiquent que le motif 2,2-diméthylchromène est lié par C-1' en C-3 sur la cétone α,β-insaturée. Par ailleurs, nous retrouvons les corrélations HMBC de OH-5 (δ_H 13,20) avec C-4a (δ_C 109,0), C-5 (δ_C 157,4), et C-6 (δ_C 105,4) et celles de OH-7 (δ_H 6,33) avec C-6 (δ_C 105,4), C-7 (δ_C 159,5), et C-8 (δ_C 110,0) permettant de construire un cycle aromatique hexasubstitué et de confirmer la présence d'un squelette isoflavone substitué en C-3 par le motif 2,2-diméthylchromène. Le caractère acide de OH-5 (δ_H 13,20) confirme sa position sur l'atome de carbone C-5 (δ_C 157,4), en β du groupement carbonyle. Le spectre de RMN ¹H présente également deux unités prényles à δ_H 3,48 (1H, d, *J* = 6,2, H-1''), 5,27 (1H, t l, *J* = 7,1, H-2''), 1,77 (3H, s l, H-4''), 1,84 (3H, s l, H-5'') et 3,46 (1H, d, *J* = 6,2, H-1'''), 5,23 (1H, t l, *J* = 7,3, H-2'''), 1,74 (3H, s l, H-4''') et 1,83 (3H, s l, H-5'''), identifiées à l'aide des corrélations COSY, NOESY et HMBC observées. Chacune de ces unités peuvent être positionnées en C-6 et C-8 sur le cycle aromatique hexasubstitué grâce aux corrélations HMBC de H-1'' (δ_H 3,48) avec C-5 (δ_C 157,4), C-6 (δ_C 105,4),

et C-7 (δ_C 159,5), ainsi que celles de H-1''' (δ_H 3,46) avec C-7 (δ_C 159,5), C-8 (δ_C 110,0), et C-8a (δ_C 153,2).

Sur la base des données obtenues et par comparaison avec les données spectrales RMN d'isoflavones apparentées (Russell *et al.*, 1990 ; Xiong *et al.*, 2009), le composé **SP-11** a été désigné comme étant le 5,7-dihydroxy-6,8-diprényl-2''',2'''-diméthylpyrano[5''',6''': 3',4']-isoflavone, et a été nommé spirotropone, d'après le nom de genre de la plante.

4.3.7 Données de RMN relatives aux spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14)

Les spectres de RMN de ces composés ont été réalisés dans le CD₃OD et les éléments de RMN ayant permis d'établir leurs structures sont décrits dans le tableau 17.

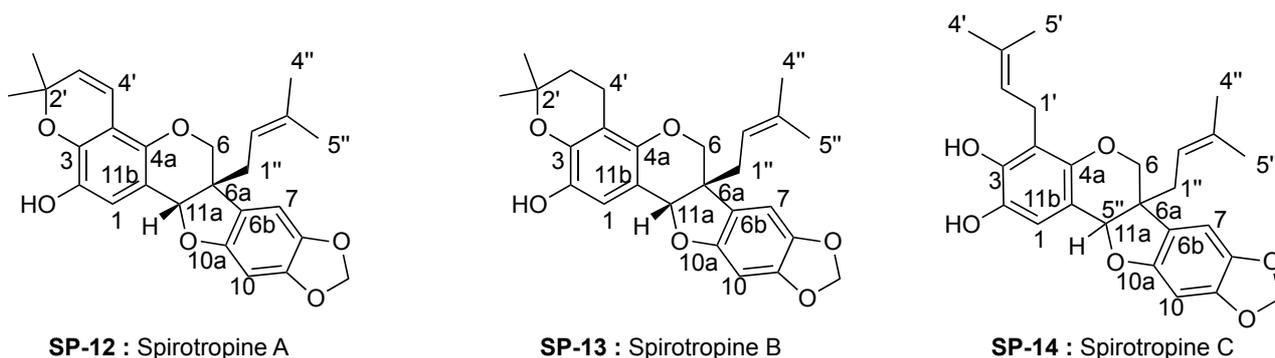


Figure 52 Structures des spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14)

Tableau 17 Données de RMN relatives aux spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14)

Position	Spirotropine A		Spirotropine B		Position*	Spirotropine C	
	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, pm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, pm)		¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, pm)
1	6.71 (1H, s)	117.5	6.70 (1H, s)	111.1	1	6.65 (1H, s)	114.2
2		141.0		140.4	2		140.2
3		142.7		145.6	3		145.7
4		111.5		118.2	4		110.5
4a		144.6		147.6	4a		148.8
6ax	3.57 (1H, d, <i>J</i> = 10.7)	71.3	3.61 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	70.9	6ax	3.57 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	71.7
6eq	3.99 (1H, d, <i>J</i> = 10.7)		3.98 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)		6eq	3.96 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	
6a		48.2		47.8	6a		48.0
6b		122.4		122.8	6b		122.8
7	6.56 (1H, s)	104.8	6.72 (1H, s)	104.7	7	6.71 (1H, s)	104.8
8		149.1		142.2	8		142.7
9		142.9		148.9	9		148.7
10	6.34 (1H, s)	94.1	6.34 (1H, s)	93.9	10	6.33 (1H, s)	94.0
10a		155.2		155.2	10a		155.1
11a	5.04 (1H, s)	83.5	5.02 (1H, s)	84.1	11a	5.01 (1H, s)	84.3
11b		112.5		114.2	11b		113.9
2'		77.3		71.4	3'		131.0
2'-CH ₃	1.41 (6H, s)	27.7	1.23 (6H, s)	28.6	4'	1.63 (3H, s)	25.7
					5'	1.73 (3H, s)	17.7
3'	5.61 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	130.4	1.66 (2H, m)	43.3	2'	5.24 (1H, m)	123.6
4'	6.56 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	117.5	2.69 (2H, m)	19.4	1'	3.30 (1H, m)	23.2
1''	2.37 (2H, m)	31.6	2.45 (2H, m)	31.3	1''	2.41 (2H, m)	31.4
2''	5.17 (1H, t1, <i>J</i> = 7.4)	119.7	5.20 (1H, t1, <i>J</i> = 7.3)	119.7	2''	5.18 (1H, t1, <i>J</i> = 7.3)	120.0
3''		135.8		135.6	3''		135.6
4''	1.66 (3H, s l)	25.9	1.68 (3H, s l)	25.7	4''	1.67 (3H, s)	25.8
5''	1.48 (3H, s l)	24.0	1.49 (3H, s l)	17.7	5''	1.48 (3H, s)	17.8
O-CH ₂ -O	5.87 (1H, d, <i>J</i> = 1.2)	102.3	5.91 (1H, d, <i>J</i> = 1.1)	102.2	O-CH ₂ -O	5.87 (1H, d, <i>J</i> = 1.0)	102.2
	5.83 (1H, d, <i>J</i> = 1.2)		5.88 (1H, d, <i>J</i> = 1.1)			5.84 (1H, d, <i>J</i> = 1.0)	

* Noter le changement de la numérotation des spirotropines A et B avec la C

Le composé **SP-12** a été isolé sous la forme d'un solide jaune pâle. Sa formule moléculaire a été déterminée comme étant $C_{26}H_{26}O_6$ par l'analyse du spectre HR-ESI-MS (m/z 435,1794 $[M+H]^+$). Le spectre de RMN 1H de **SP-12** présente un enchainement caractéristique de signaux du proton à δ_H 2,37 (2H, m, H-1''), 5,17 (1H, t 1, $J = 7,4$, H-2''), 1,66 (3H, s 1, H-4''), 1,48 (3H, s 1, H-5'') porté par les atomes de carbone à δ_C 31,6 (C-1''), 119,7 (C-2''), 135,8 (C-3''), 25,9 (C-4'') et 24,0 (C-5) dans le spectre de RMN ^{13}C , montrant que **SP-12** possède un motif prényle.

D'autre part, les signaux de RMN 1H à δ_H 3,57 (1H, d, $J = 10,7$, H-6_{ax}), 3,99 (1H, d, $J = 10,7$, H-6_{eq}) portés par l'atome de carbone à δ_C 71,3 (C-6) et leurs corrélations HMBC¹ avec C-6a (δ_C 48,2), C-6b (δ_C 122,4), C-11a (δ_C 83,5), C-4a (δ_C 144,6) et C-1'' (δ_C 31,6), ainsi que le signal de RMN 1H à δ_H 5,04 (1H, s, H-11a) porté par l'atome de carbone à δ_C 83,5 (C-11a) et les corrélations HMBC de celui-ci avec C-1 (δ_C 117,5), C-11b (δ_C 112,5), C-4a (δ_C 144,6), C-6 (δ_C 71,3) et C-6a (δ_C 48,2) suggèrent que ce motif prényle est connecté en C-6a à un squelette correspondant à celui d'un ptérocarpane. Cette suggestion est confirmée par le signal de RMN 1H à δ_H 6,71 (1H, s, H-1) porté par l'atome de carbone à δ_C 117,5 (C-1) et les corrélations HMBC de celui-ci avec C-2 (δ_C 141,0), C-3 (δ_C 142,7), C-4a (δ_C 144,6), C-11a (δ_C 83,5) et C-11b (δ_C 112,5) indiquant la présence d'un cycle aromatique pentasubstitué. De même, les signaux de RMN 1H à δ_H 6,56 (1H, s, H-7) et 6,34 (1H, s, H-10) portés respectivement par les atomes de carbone à δ_C 104,8 (C-7) et 94,1 (C-10) et les corrélations HMBC¹ de H-7 (δ_H 6,56) avec C-8 (δ_C 149,1), C-9 (δ_C 142,9), C-10a (δ_C 155,2) et C-6a (δ_C 48,2) ainsi que celles de H-10 (δ_H 6,34) avec C-10a (δ_C 155,2), C-6b (δ_C 122,4), C-8 (δ_C 149,1) et C-9 (δ_C 142,9) correspondent à un cycle aromatique 1,2,4,5-tétrasubstitué. Un groupe méthylènedioxy constitué de deux protons non équivalents à δ_H 5,87 (1H, d, $J = 1,2$, O-CH₂-O) et 5,83 (1H, d, $J = 1,2$, O-CH₂-O) s'observe également dans le spectre de RMN 1H . Les corrélations HMBC¹ de ces protons (δ_H 5,87, δ_H 5,83) avec C-8 (δ_C 149,1) et C-9 (δ_C 142,9) montrent que le groupe méthylènedioxy est lié en C-8 et C-9 à ce cycle tétrasubstitué cité précédemment. Les signaux de RMN 1H à δ_H 6,56 (1H, d, $J = 10,0$, H-4'), 5,61 (1H, d, $J = 10,0$, H-3') et 1,41 (6H, s, 2'-CH₃), combinés avec les signaux du spectre de RMN ^{13}C à δ_C 117,5 (C-4'), 140,4 (C-3'), 77,3 (C-2'), 27,7 (2'-CH₃), ainsi que les corrélations proton-carbone à longue distance observées en HMBC, indiquent la présence d'un anneau 2,2-diméthyl-pyrane. De surcroît, les corrélations HMBC¹ de H-1' (δ_H 6,56) avec C-3 (δ_C 142,7), C-4 (δ_C 111,5) et C-4a (δ_C 144,6), ainsi que le déplacement chimique de C-2' (δ_C 77,3) et la formule moléculaire de **SP-12** indiquent que l'anneau 2,2-diméthyl-pyrane est fusionné en C-3 et C-4 au cycle aromatique pentasubstitué. La position de

¹ Pour les corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A, B et C, voir tableau

l'anneau 2,2-diméthyl-pyrane et celle du groupe méthylènedioxy sont établies également par comparaison avec les données de RMN du 2,3-dihydroxy-8,9-méthylènedioxy-ptérocarpane et du 6a-prényl-ptérocarpane apparentés (Miyase *et al.*, 1999 ; Xiong *et al.*, 2009). La jonction de cycle *cis* peut être établie sans ambiguïté par l'observation de corrélations NOESY¹ entre les protons H-1'' et H-11a (Figure 53 et figure 54). Par ailleurs, le spectre CD présente une bande positive à 288.3 nm ($\Delta\epsilon = 2,92$), une bande négative à 327 nm ($\Delta\epsilon = -5,42$), et le composé **12** présente aussi une forte valeur positive du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} +147.3^\circ$ (AcOEt, *c* 0.164) ; ceci semble indiquer une configuration 6a(*S*), 11a(*S*) en accord avec la littérature (Botta *et al.*, 2009). Ainsi, **SP-12** a été identifié comme étant le 2-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-2',2'-diméthylpyrano-[5',6':4,3]-6a-prényl-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane et a été dénommé spirotropine A.

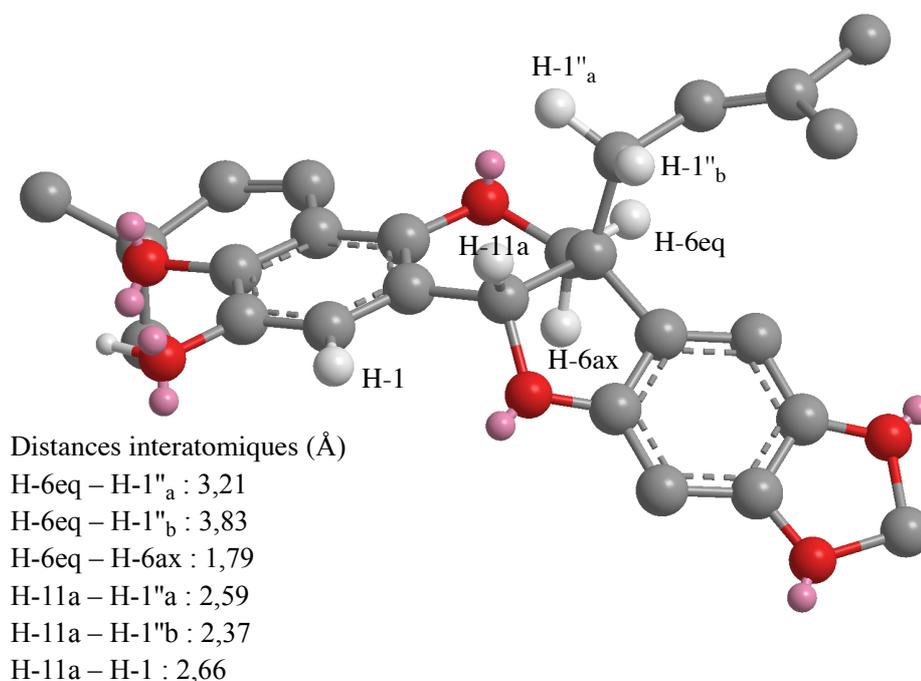


Figure 53 Visualisation tridimensionnelle de la spirotropine A avec les distances entre les hydrogènes au niveau de l'enchaînement C6, C6a, C11a

Le composé **SP-13** a été isolé également sous la forme d'un solide jaune pâle. Sa formule moléculaire a été déterminée comme étant $C_{26}H_{28}O_6$ par l'analyse du spectre HR-ESI-MS (m/z 437,1961 $[M+H]^+$). Les spectres de RMN ¹H et ¹³C de **SP-13** sont très similaires avec ceux du composé **SP-12**. Nous retrouvons encore les motifs des cycles aromatiques penta- et tétrasubstitués,

¹ Pour les corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A, B et C, voir tableau 31,

ainsi qu'un motif isoprényle situé en 6a d'un squelette qui s'avère être alors un ptérocarpane. Seuls les signaux des protons de H-4', H-3', C-4' et C-3' se sont déplacés vers les champs forts, de δ_H 6,56 vers δ_H 2,69 pour H-4', de δ_H 5,61 vers δ_H 1,66 pour H-3', de δ_C 117,5 vers δ_C 19,4 pour C-4' et de δ_C 130,4 vers δ_C 43,3 pour C-3', les autres déplacements chimiques restant quasi identiques. Nous pouvons observer ainsi la présence à nouveau d'un motif gem-diméthyle à δ_H 1,23 (2'-CH₃) et il peut être ainsi démontré que l'anneau 2,2-diméthyl-2*H*-pyrane est remplacé par un anneau 2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrane. La configuration absolue en C-6a et C-11a est alors établie comme étant 6a(*S*), 11a(*S*) du fait de la corrélation NOESY¹ H-11a (δ_H 5,02) avec H-1'' (δ_H 2,45), de la valeur de la rotation optique $[\alpha]_D^{25} +107,6^\circ$ (AcOEt, *c* 0,054) et de la similitude entre les spectres CD de **SP-12** et **SP-13**. Ainsi, **SP-13** a été identifié comme étant le 2-hydroxy-8,9-méthylendioxy-2',2'-diméthyl-3',4'-dihydropyrano-[5',6':4,3]-6a-prényl-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane et a été nommé spirotropine B.

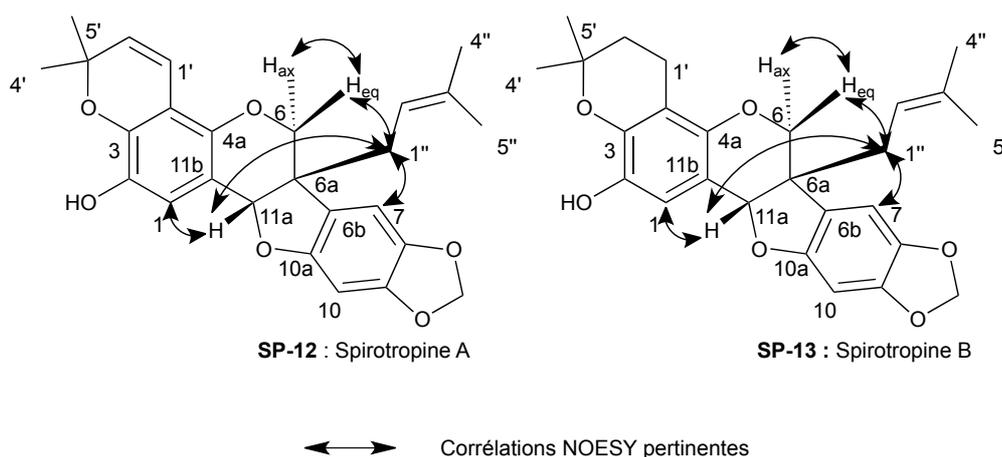


Figure 54 Corrélations NOESY déterminantes pour l'établissement la configuration relative de SP-12 et SP-13

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C de **SP-14** sont très similaires avec ceux du composé **SP-12**. Toutefois, ce composé s'est dégradé dans le temps rendant impossible la réalisation d'expérience de mesure de pouvoir rotatoire et de NOESY. Sa formule moléculaire a été déterminée comme étant C₂₆H₂₈O₆ par l'analyse du spectre HR-ESI-MS (*m/z* 437,1964 [M+H]⁺). Nous retrouvons encore les motifs des cycles aromatiques penta et tétrasubstitués, ainsi qu'un motif isoprényle situé en 6a du squelette ptérocarpane. Seuls les déplacements de H-4' et C-4' se sont déplacés vers les champs forts, de δ_H 6,56 vers δ_H 3,30 pour H-4' et de δ_C 117,5 vers δ_C 23,2 pour C-4', et le déplacement de C-2' vers les champs faibles, de δ_C 77,3 vers δ_C 131,0 ; les autres déplacements chimiques restant quasi identiques. Il peut être ainsi démontré que l'anneau 2,2-diméthyl-pyrane est remplacé par un

¹ Pour les corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A, B et C, voir tableau 31,

groupe prényle en position 4. Ainsi, **SP-14** a été identifié comme pouvant très certainement être le 2-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-4,6a-prényl-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane, de configuration absolue vraisemblablement identique à celle des deux analogues décrits précédemment. Ce composé a été nommé spirotropine C.

4.3.8 Etat de l'art relatif aux composés isolés

Les isoflavones (la daidzéine, la génistéine et l'isoprunétine) ont déjà été isolées de nombreux végétaux (Reinwald et Weaver, 2006). Les activités biologiques les plus marquantes sont leurs propriétés protectrices contre le cancer (Virk-Baker *et al.*, 2010), grâce notamment à leurs capacités antioxydantes (Pietta, 2000) et grâce au fait qu'ils se comportent comme des phytoestrogènes (Halabalaki *et al.*, 2006).

Le lupéol est un triterpène également très commun chez les végétaux. Il possède diverses activités biologiques décrites, les plus notables étant ses activités anticancéreuses (Laszczyk, 2009) et antifongiques (Shai *et al.*, 2008).

Les trois stilbènes (picéatannol, *trans*-resvératrol et *trans*-oxyresvératrol) sont aussi des composés connus et bien étudiés. Il sont connus pour être des phytoalexines antifongiques (Brinker et Seigler, 1991), mais aussi pour posséder des activités anti-leucémiques (Ferrigni *et al.*, 1984 ; Manila *et al.*, 1993) et inhibitrices des protéines kinase (Geahlen et McLaughlin, 1989).

Les 3 oligostilbènes (les gnétines D et E et le latifolol) sont des dimères (gnétine D) et trimères (gnétine E et latifolol) hydroxylés du stilbène rencontrés principalement dans les espèces appartenant au genre *Gnetum* (Gnetaceae) (Ali *et al.*, 2003 ; Boralle *et al.*, 1993 ; Iliya *et al.*, 2001 ; Iliya *et al.*, 2002a ; Iliya *et al.*, 2002b ; Lins *et al.*, 1982a) et *Cyphostemma* (Vitaceae) (Bala *et al.*, 2000). Ces composés sont assez rares et n'ont jamais été isolés de la famille des Leguminosae – Papilionoideae. Etant des polyphénols, il est probable qu'ils possèdent une activité antioxydante (Ha *et al.*, 2009). Il a été démontré que la gnétine D possède une activité antivirale (Liu *et al.*, 2010) et que la gnétine E possède une activité antibactérienne sur des souches résistantes de *Staphylococcus aureus* avec des CIM de l'ordre de 4 à 8 µg/mL (Nitta *et al.*, 2002).

La spirotropone (**SP-11**) n'a jamais été isolée et décrite dans la littérature, c'est donc une molécule inédite. Ce composé fait partie des isoflavonoïdes prénylés, dont il a été décrit qu'ils sont de distribution limitée essentiellement à quelques espèces de la famille des Leguminosae (Lapčík, 2007). Les isoflavonoïdes prénylés sont souvent des phytoalexines possédant parfois des propriétés

antifongiques (Barron et Ibrahim, 1996). De la même manière, les ptéocarpanes prénylés isolés **SP-12**, **SP-13** et **SP-14** (respectivement les spirotropines A, B et C) sont des molécules inédites, qui pourraient être des phytoalexines de *Spirotropis longifolia* et posséder des propriétés biologiques semblables (Jiménez-Gonzalez *et al.*, 2008).

4.3.9 Activités biologiques des composés isolés

En général, toutes les molécules isolées ont été testées sur au moins une souche fongique. Pour quelques composés, en particulier les molécules inédites, la faible quantité isolée a limité la possibilité de les tester sur plusieurs souches. Les valeurs de CIM sont indiquées en $\mu\text{g/mL}$. Les activités cytotoxiques sur la lignée cellulaire KB sont exprimées en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire, pour une concentration de 10^{-5}M . Sur les lignées cellulaires MDA-MB-435 et MRC5, la CI_{50} a été déterminée pour une gamme de concentrations allant de 128,0 à 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Les données sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 Concentrations inhibitrices minimales (CIM, µg/mL), capacités antiprolifératives (%) et CI₅₀ (µg/mL) des composés isolés de *S. longifolia*: daidzéine (SP-1), génistéine (SP-2), isopruneétine (SP-3), lupéol (SP-4), picéatannol (SP-5), *trans*-resvératrol (SP-6), gnétine D (SP-7), gnétine E (SP-8), latifolol (SP-9), *trans*-oxyresvératrol (SP-10), spirotropone (SP-11), spirotropine A (SP-12), spirotropine B (SP-13) et spirotropine C (SP-14)

Souche/lignée cellulaire	Flu*	Itra	Doc	SP-1	SP-2	SP-3	SP-4	SP-5	SP-6	SP-7	SP-8	SP-9	SP-10	SP-11	SP-12	SP-13	SP-14
CIM en µg/mL																	
<i>M. canis</i> LMGO 25	2	0,5				> 64	> 64	16	> 64	16	8		32		> 64		
<i>M. canis</i> LMGO 22	> 64	> 16				> 64	> 64	> 64	> 64	64	16		> 64		> 64		
<i>M. gypseum</i> LMGO 10	32	0,25			> 64	> 64	> 64	8	> 64	16	2		32		> 64		
<i>T. rubrum</i> LMGO 08	> 64	> 16				> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	64		16		> 64		
<i>T. rubrum</i> LMGO 06	2	0,25			> 64	> 64	> 64	8	> 64	8	2		16		> 64		
<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 09	> 64	> 16				> 64	> 64	64	> 64	32	8		8		> 64		
<i>C. albicans</i> LMGO 102	> 64	> 16			16	> 64	> 64	2	> 64	64	16		> 64		> 64		
<i>C. albicans</i> ATCC 102321	4	0,5				> 64	> 64	2	> 64	2	16		> 64		> 64		
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4	0,5		> 64	64	> 64	> 64	4	> 64	64	16	64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	4	0,5				> 64	> 64	1	> 64	2	16		> 64		> 64		
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	8	0,5			16	> 64	> 64	4	> 64	32	4		> 64		> 64		
<i>C. tropicalis</i> LMGO 35	1	0,25				> 64	> 64	8	> 64	4	16		64		> 64		
<i>C. Krusei</i> LMGO 174	32	> 16			64	> 64	> 64	8	> 64	2	8		16		> 64		
<i>C. gatti</i> LMGO L1	2	0,25				> 64	> 64	16	> 64	64	8		> 64		> 64		
Activité antiproliférative à 10 ⁻⁵ M (%)																	
KB			99	0	0	0	0		0					11	56	0	
Activité antiproliférative (CI ₅₀ en µg/mL)																	
MRC5	> 128	> 128	< 0,25					> 128		> 128	25,0	125,5	128				
MDA-MB-435	> 128	> 128	< 0,25					103,3		88,1	61,0	64,2	37,8				

* Flu : Fluconazole, Itra : Itraconazole, Doc : Docetaxel

Quatre molécules en particulier ont montré de bonnes activités antifongiques : le picéatannol (**SP-5**), la gnétine D (**SP-7**), la gnétine E (**SP-8**) et dans une moindre mesure le *trans*-oxyresvérol (**SP-10**). La meilleure activité a été observée pour le picéatannol sur *C. parapsilosis* LMGO 05, avec une valeur de CIM de 1 µg/mL, alors que la gnétine D et la gnétine E ont présenté respectivement sur cette même souche une valeur de 2 et 16 µg/mL. Le picéatannol et la gnétine D ont montré des activités autour de 2 à 4 µg/mL sur les levures, alors que la gnétine E semble être plus active sur les champignons dermatophytes avec des valeurs de CIM souvent inférieures à 10 µg/mL.

Les champignons qui ont montré la plus grande résistance aux composés sont *M. canis* LMGO 22, *T. rubrum* LMGO 08 et *C. albicans* LMGO 102. Ces souches sont également résistantes aux contrôles positifs utilisés dans le test. Pourtant, le picéatannol (**SP-5**), la gnétine D (**SP-7**) et la gnétine E (**SP-8**) ont montré des activités notables sur ces souches résistantes.

Cette activité antifongique sur les souches résistantes est toutefois à relativiser lorsque l'on observe les activités antiprolifératives. En effet, tous les stilbènes et oligostilbènes – le picéatannol (**SP-5**), la gnétine D (**SP-7**), la gnétine E (**SP-8**), le latifolol (**SP-9**) et le *trans*-oxyresvérol (**SP-10**) – ont montré des cytotoxicités relativement importantes en comparaison du fluconazole et de l'itraconazole, avec des CI_{50} entre 37,8 et 103,3 µg/mL sur la lignée cancéreuse MDA-MB-435.

De fait, le picéatannol est le composé présentant la meilleure sélectivité, avec des valeurs de CIM proches de celles du fluconazole, pour un indice de sélectivité entre 100 et 13 sur les levures du genre *Candida*.

Concernant les molécules inédites – spirotropone (**SP-11**), spirotropine A (**SP-12**), spirotropine B (**SP-13**) et spirotropine C (**SP-14**) ; les activités biologiques ont surtout pu être évaluées avec la spirotropine A, isolée en plus grande quantité. Tous ces composés ne semblent pas posséder d'activité antifongique sur les souches testées. Par contre, la spirotropine A (**SP-12**) a montré une activité antiproliférative importante de 56% sur la lignée cellulaire KB qui pourrait être due aux groupements isoprényliques. La toxicité des flavonoïdes prénylés serait plus due à la position des groupements prényles qu'à leur nombre, ce qui pourrait expliquer les variations de l'activité cytotoxique entre les composés prénylés isolés (Barron et Ibrahim, 1996).

Tous les composés isolés, en dehors du lupéol (**SP-4**), dérivent de la voie de biosynthèse du phénylpropanoïde (Du *et al.*, 2010) et sont généralement connus pour être des phytoalexines

(Dixon et Ferreira, 2002 ; Lozovaya *et al.*, 2007 ; Yamada *et al.*, 2004). Ces composés sont capables d'inhiber la croissance fongique et sont relativement toxiques vis-à-vis des cellules animales. Il a été montré que la monodominance se met en place grâce à un assemblage de particularités, et non une seule (Torti *et al.*, 2001). Les résultats obtenus peuvent donc en partie expliquer la durabilité et la monodominance de *Spirotropis longifolia* et suggèrent que les défenses chimiques sont un facteur déterminant pour l'établissement de cette monodominance (Fonty *et al.*, in press). Cette étude phytochimique permet pour la première fois de décrire d'un point de vue chimique le genre *Spirotropis* et est un complément d'information chimiotaxonomique important pour la famille des Leguminosae – Papilionoideae.

4.4 Composés isolés de *Unonopsis rufescens*

Il a été isolé une molécule à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *U. rufescens*, l'ursuline (UR-1, figure 55).

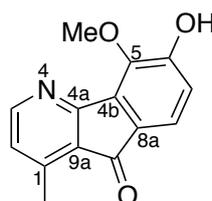


Figure 55 Structure de l'ursuline (UR-1) isolée de *U. rufescens*

4.4.1 Données relatives à l'ursuline (UR-1)

Le spectre de RMN de ce composé a été réalisé dans le CDCl₃ et les éléments de RMN ayant permis d'établir sa structure sont décrits dans le tableau 19.

Tableau 19 Données de RMN relatives à l'ursuline (UR-1)

	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm)	COSY	HMBC (¹ H → ¹³ C) ^a
1		146.2		
2	6.95 (1H, d, <i>J</i> = 5.3)	125.2	H3, C1-Me	C1-Me, C3
3	8.47 (1H, d, <i>J</i> = 5.3)	152.0	H2	C1, C2, C4a
4				
4a		162.6		
4b		128.4		
5		143.0		
6		155.0		

7	6.94 (1H, d l, <i>J</i> = 7.8)	115.0	H8	C5, C6, C8a
8	7.44 (1H, d, <i>J</i> = 7.8)	121.0	H7	C4b, C6, C9
8a		133.4		
9		190.7		
9a		126.7		
C1-Me	2.63 (3H, s)	16.9	H2	C1, C2, C9a
C6-OMe	4.21 (3H, s)	62.2		C5

^a Les interactions faibles sont notées en italiques

L'ursuline fait partie du groupe chimique des 1-méthyl-4-azafluorén-9-ones, avec un noyau pyridinique 1,2,3-trisubstitué identifiable par l'enchaînement des signaux à δ_H 8,47 ppm (1H, d, *J* = 5,3, H-3) et 6,95 ppm (1H, d l, *J* = 5,3, H-2). Le signal à 2,63 ppm (3H, s, C1-Me) correspond à un groupe méthyle arylique lié au noyau pyridine, identifié grâce aux corrélations COSY et HMBC, formant le motif 4-méthylpyridine. En outre, l'enchaînement des signaux à δ_H 6,94 ppm (1H, d l, *J* = 7,8, H-7) et 7,44 ppm (1H, d, *J* = 7,8, H-8) est caractéristique d'un noyau 1,2,3,4-tetrasubstitué. Enfin, les corrélations HMBC H3→C4a, H7→C4b, H8→C8a, C9 et C1-Me→C9a ont permis la d'attester de la présence d'une fonction carbonyle et de construire la cyclopentanone. Les données de RMN sont en accord avec la littérature (Laprévotte *et al.*, 1988).

4.4.2 Etat de l'art relatif à l'ursuline

L'ursuline a été isolée pour la première fois de *Unonopsis spectabilis* (Laprévotte *et al.*, 1988) puis ensuite d'autres Annonaceae des genres *Guatteria* (Berthou *et al.*, 1989 ; Cortes *et al.*, 1986 ; Cortes *et al.*, 1985) et *Polyalthia* (Lavault *et al.*, 1990). Il n'existe pas d'activité biologique décrite pour l'ursuline, mais l'onychine – squelette de base des azafluorénones – a déjà été décrite comme possédant des propriétés antifongiques (Hufford *et al.*, 1987) qui sont contestées (Koyama *et al.*, 2005).

4.4.3 Activités biologiques de l'ursuline

L'ursuline n'a pas présenté d'activité antifongique sur les souches testées. Pourtant, ce composé a présenté dans le test de perforation un halo d'inhibition de 30 et 45 mm sur *T. rubrum* LMGO 4218 et *C. albicans* ATCC 10231, c'est-à-dire un diamètre d'inhibition suggérant une forte activité. Encore une fois, ceci prouve la grande différence de mesure d'activité entre le test de perforation et le test de microdilution. En relation à l'activité cytotoxique, l'ursuline n'a pas non plus présenté d'activité antiproliférative sur la lignée cellulaire KB pour une concentration de 10^{-5} M.

Tableau 20 Concentrations inhibitrices minimales (CIM, µg/mL) et capacités antiprolifératives (%) de l'ursuline (UR-1)

Souche/lignée cellulaire	Fluconazole	Itraconazole	Docetaxel	Ursuline
CIM en µg/mL				
<i>M. canis</i> LMGO 22	> 64	> 16		> 64
<i>M. gypseum</i> LMGO 10	16	0,25		> 64
<i>M. canis</i> LMGO 25	2	0,5		> 64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4	0,5		> 64
<i>C. glabrata</i> LMGO 44	8	0,5		> 64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	4	0,5		> 64
<i>C. parapsilosis</i> LMGO 05	4	0,5		> 64
<i>C. krusei</i> LMGO 174	> 64	16		32
Activité antiproliférative à 10 ⁻⁵ M (%)				
KB			99	0

4.5 Conclusions sur les composés isolés

L'objectif de cette partie du travail était d'isoler et d'identifier les composés pouvant être responsables de l'activité antifongique d'extraits provenant de bois résistants à la dégradation fongique ; et d'étudier une possible valorisation de leurs propriétés biologiques pour le développement d'antimycotiques. Dans le cas de *S. longifolia*, l'étude phytochimique a été approfondie afin d'établir un profil chimiotaxonomique de cette espèce méconnue d'un point de vue chimique.

Il a pu être isolé 21 molécules à partir de 4 espèces appartenant à 3 familles botaniques : *Humiria balsamifera* – Humiriaceae, *Spirotropis longifolia* – Leguminoseae - Papilioideae, *Peltogyne* sp – Leguminoseae - Caesalpinioideae, et *Unonopsis rufescens* – Annonaceae. Parmi celles-ci, 4 molécules inédites ont été isolées à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines et des racines adventives de *Spirotropis longifolia* : la spirotropone (SP-11), la spirotropine A (SP-12), la spirotropine B (SP-13) et la spirotropine C (SP-14). Trois autres molécules isolées de ces mêmes extraits apportent des informations chimiotaxonomiques importantes pour la famille des Leguminoseae : la gnétine D (SP-7), la gnétine E (SP-8) et le latifolol (SP-9). Ces molécules sont des oligostilbènes rares du règne végétal et n'avaient auparavant jamais été isolées de cette famille. Les autres molécules isolées sont généralement communes au règne végétal, ou bien ont déjà été isolées des espèces sélectionnées, hormis l'acide déhydroarjunolique (HB-3), composé assez rare, isolé de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Humiria balsamifera*.

Ces molécules ont pu être étudiées pour leurs propriétés biologiques sur diverses souches de champignons pathogènes humains (levures et dermatophytes) et sur des lignées cellulaires humaines (saines et cancéreuses). Parmi les 21 molécules isolées, 7 ont démontrés des activités antifongiques moyennes à fortes :

- L'acide maslinique (**HB-2**) avec des valeurs de CIM sur les champignons dermatophytes comprises entre 8 et 32 µg/mL
- Le (+)-mopanol (**P-1**) avec des valeurs de CIM sur les levures comprises entre 0,5 et 4 µg/mL
- Les gnétines D (**SP-7**) et E (**SP-8**) avec des valeurs de CIM comprises entre 2 et 64 µg/mL
- Le picéatannol (**SP-5**) avec des valeurs de CIM comprises entre 1 et 16 µg/mL
- La bergénine (**HB-1**) avec des valeurs de CIM sur les levures comprises entre 4 et 32 µg/mL
- L'ursuline (**UR-1**) avec un diamètre de halo d'inhibition compris entre 30 et 45 mm

Lorsque ces données d'activités antifongiques sont croisées avec les mesures de capacités antiprolifératives, nous pouvons noter que nombre de ces molécules possèdent une toxicité notable envers les cellules humaines.

Les oligostilbènes trimères du resvératrol (gnétine E et latifolol) montrent de fortes cytotoxicités et sont peu spécifiques des cellules fongiques. Malgré tout, l'étude de ces composés peu communs au règne végétal est intéressante pour la compréhension de leurs rôles écologiques. En outre le picéatannol, composé polyphénolique semblable au resvératrol, semble montrer une toxicité plus faible, avec une spécificité d'action envers les cellules fongiques comparable au fluconazole. La bergénine, bien que moins antifongique que le picéatannol, possède également de bonnes activités antifongiques sur les levures pour une cytotoxicité faible ; alors que le (+)-mopanol, fortement toxique pour les levures, montre une cytotoxicité comparable à l'itraconazole. L'ursuline quant à elle, présente une excellente inhibition de croissance sur la base des tests de perforation, sans paraître pour autant antifongique lors des tests en milieu liquide.

Pour ces raisons, il a été entrepris dans la suite des travaux des études microbiologiques afin de mieux comprendre de quelle manière agissent ces composés.

PARTIE 5. INFLUENCE DES COMPOSÉS ACTIFS SUR LES CROISSANCES FONGIQUES

5.1 Introduction

Notre objectif dans cette partie de l'étude était d'approfondir les connaissances sur les interactions entre les composés antifongiques isolés et les champignons pathogènes humains. Il a pu ainsi être mis en place des expériences *in vitro* afin d'évaluer le mode d'action de ces composés.

5.2 Etude par microscopie de fluorescence sur *T. rubrum* LMGO 4218

L'observation de modifications provoquées par les composés antifongiques sur la morphologie des champignons peut apporter de nombreuses informations sur le mécanisme d'action des composés (Escalante *et al.*, 2008). Dans cette partie du travail, les modifications morphologiques au niveau de la paroi cellulaire de *T. rubrum* LMGO 4218 ont pu être observées en comparant un champignon non traité avec un champignon traité par un composé en concentration sub-inhibitrice.

Le colorant utilisé est le Calcofluor White (CFW). Celui-ci possède la propriété de se lier à la cellulose et à la chitine permettant ainsi de visualiser la paroi cellulaire (Herth et Schnepf, 1980). Les images ont été obtenues par un microscope à épifluorescence avec un agrandissement de 40×.

5.2.1 Etude de l'effet de la gnétine E (SP-8) sur la morphologie de *T. rubrum*

T. rubrum LMGO 4218 en croissance a été observé par microscopie d'épifluorescence en présence d'une concentration sub-inhibitrice (1 µg/mL) de gnétine E. Les images obtenues sont présentées dans la figure 56.

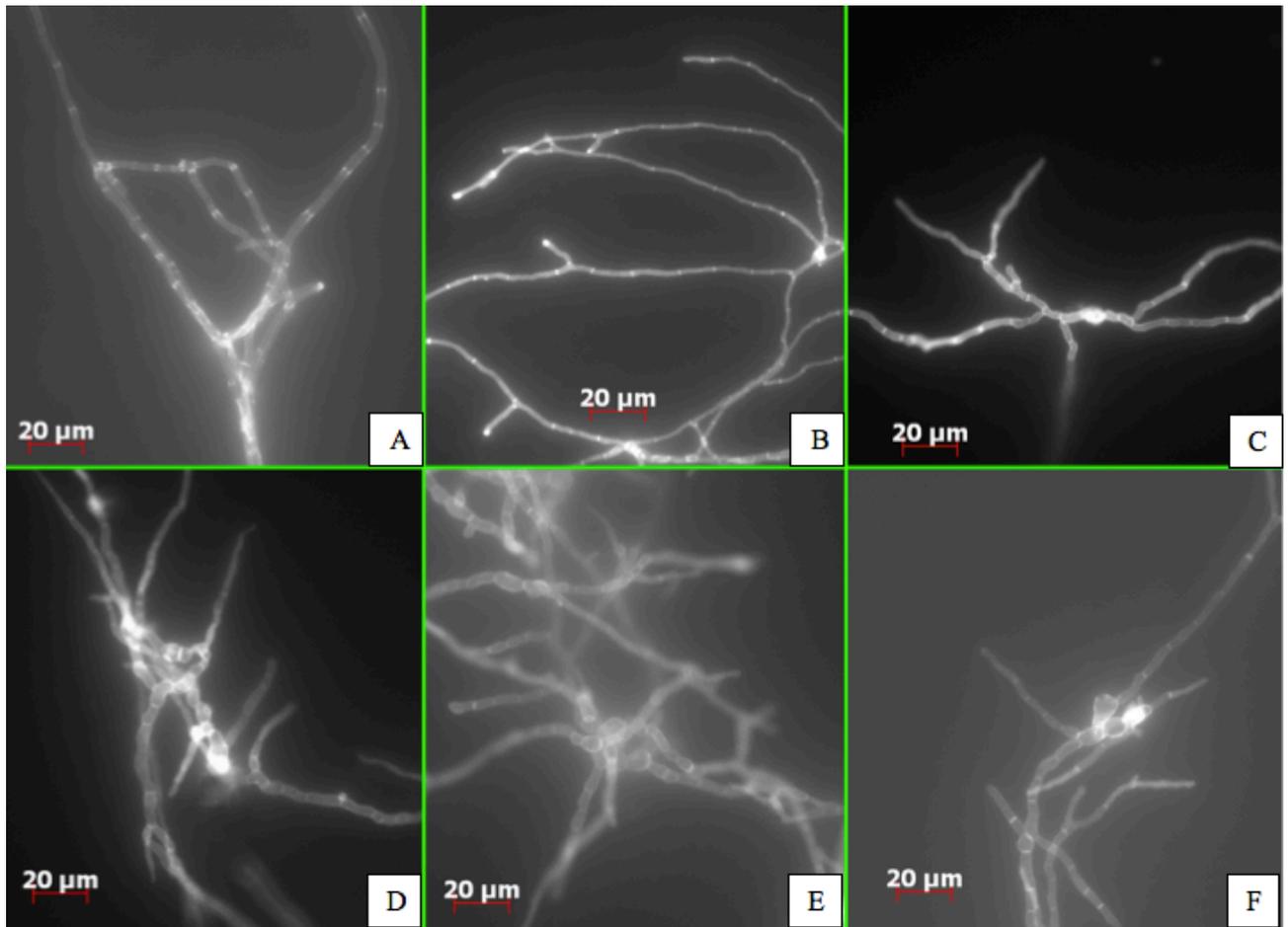


Figure 56 Actions de la gnétine E sur la morphologie des hyphes de *T. rubrum* LMGO 4218 dans une concentration sub-inhibitrice de 1 µg/mL (Colorant : Calcofluor white) ; A et B: contrôles négatifs sans traitement ; C,D,E et F : avec traitement

Le champignon non traité possède certaines caractéristiques physiologiques qu'il est nécessaire d'observer avant de comparer avec le champignon traité. Les champignons filamenteux dermatophytes tel que *T. rubrum* sont des organismes possédant un appareil végétatif pluricellulaire appelé mycélium. Ce mycélium est composé d'un ensemble de filaments plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, assurant les échanges avec le substrat. Un grossissement détaillé d'une partie du mycélium peut être observé sur la figure 57 :

- Les hyphes sont réguliers et fins (1)
- Les ramifications sont espacées de manière ordonnée, avec une croissance uniforme (2)
- Les cellules sont parallélépipédiques, symétriques et séparées par des septa étroits et droits (3)

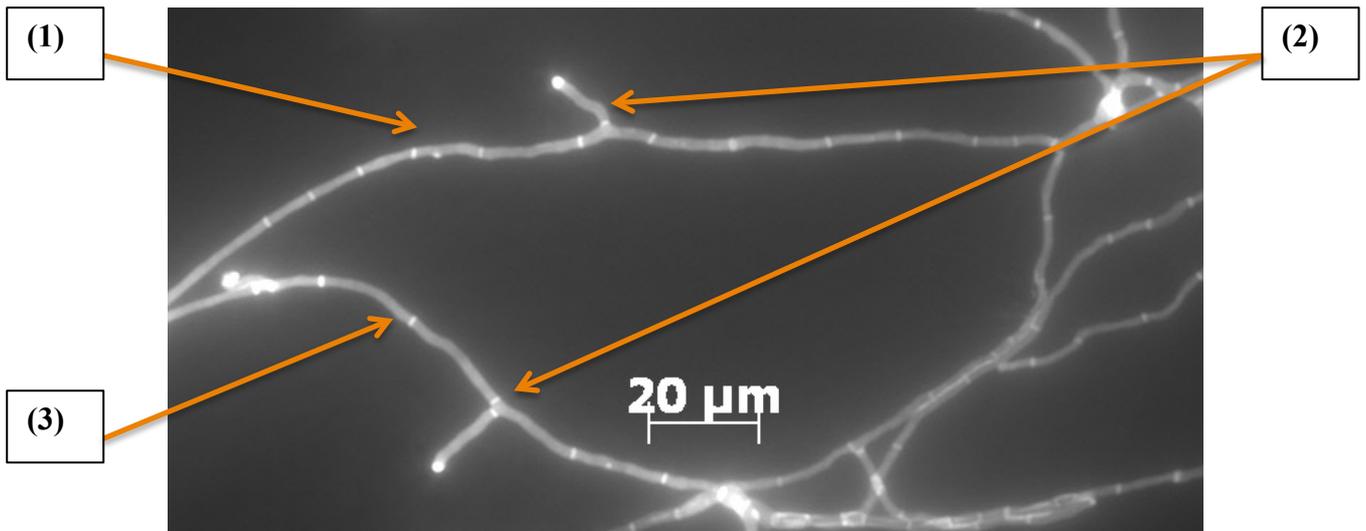


Figure 57 *T. rubrum* LMGO 4218 non traité coloré au Calcofluor White (détail)

Au contraire, la morphologie de *T. rubrum* LMGO 4218 traité par la gnétine E (SP-8) dans une concentration sub-inhibitrice de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ présente des déformations importantes. Il peut en effet être observé sur la figure 58 que :

- Les cellules sont arrondies, globulaires, enflées et asymétriques
- Les hyphes sont pliées et tordues
- Les ramifications sont désorganisées
- Les septa conservent une structure étroite malgré ces altérations

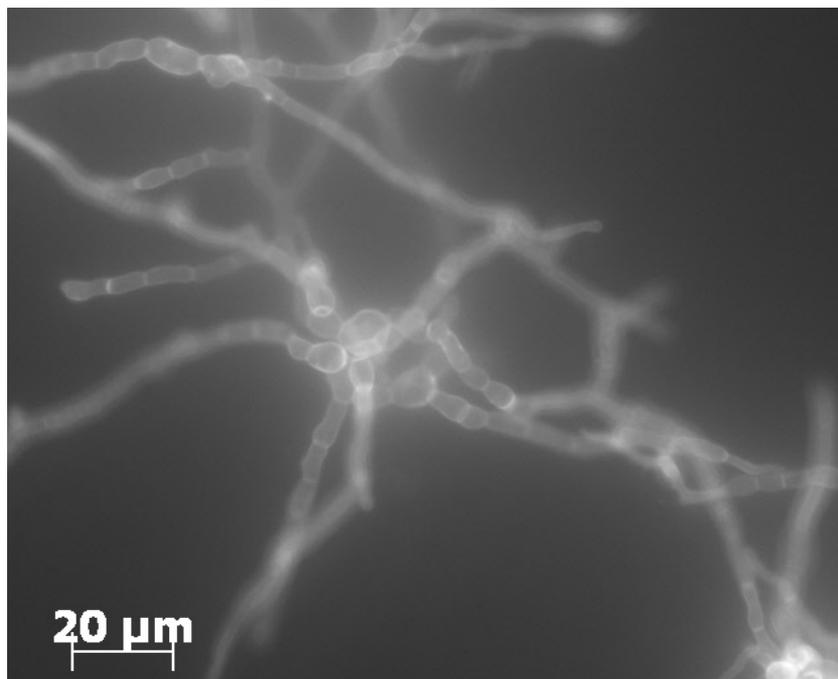


Figure 58 *T. rubrum* LMGO 4218 traité avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gnétine E (SP-8) (détail)

Il peut être conclu à ce niveau d'observation et dans ces conditions d'expérience (concentration de gnétine E, milieu de culture, température, colorant utilisé...) que la gnétine E affecte la structure de la cellule fongique, conduisant à un gonflement des hyphes par augmentation de l'épaisseur de l'enveloppe cellulaire. Celle-ci peut subir ces modifications soit indirectement par inhibition de la voie de synthèse de ses composants (Gunji *et al.*, 1983), provoquant ainsi une altération de sa composition et donc de ses propriétés biomécaniques, soit directement par modification de sa propre architecture (Cushnie et Lamb, 2005) avec une altération physique de sa structure. Dans le premier cas, la gnétine E pourrait par exemple affecter la voie de synthèse des glucanes, constituants assurant le maintien de la paroi (Gunji *et al.*, 1983). Dans le deuxième cas, la gnétine E serait capable d'altérer la structure périphérique tout en modifiant l'intégrité de l'enveloppe cellulaire (Cushnie et Lamb, 2005). Cette propriété bien particulière des composés polyphénoliques est due entre autres à la présence de groupements hydroxyles (Arif *et al.*, 2009). L'hypothèse que la gnétine E puisse altérer la structure de l'enveloppe cellulaire, comme cela a déjà été évoqué dans la partie 4 (p. 123), est ainsi la plus plausible.

5.2.2 Etude de l'effet de l'acide maslinique (HB-2) sur la morphologie de *T. rubrum*

T. rubrum LMGO 4218 en croissance a été observé par microscopie d'épifluorescence en présence d'une concentration sub-inhibitrice (4 µg/mL) d'acide maslinique. Les images obtenues sont présentées dans la figure 59.

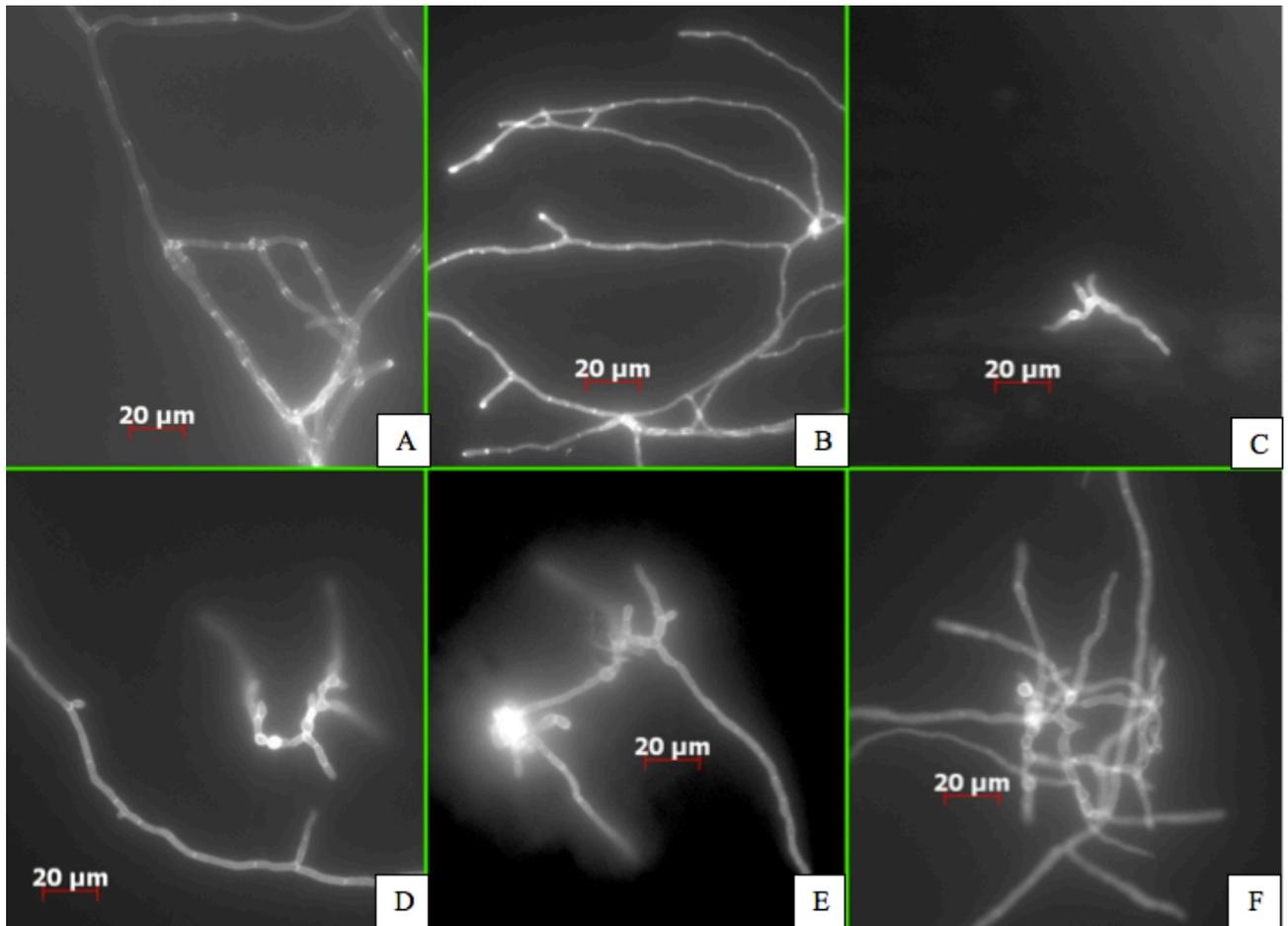


Figure 59 Effet de l'acide maslinique (HB-2) à 4 µg/mL sur *T. rubrum* LMGO 4218 ; (Colorant: Calcofluor White) ; A et B: Contrôles négatifs ; C, D, E et F: avec traitement

Les effets de l'acide maslinique sont assez semblables à ceux de la gnétine E. On peut également observer une altération des cellules, avec un repliement des hyphes et une désorganisation des ramifications. Toutefois, les ramifications paraissent plus affectées encore que dans le cas de la gnétine E, comme si l'acide maslinique interférait dans la croissance fongique en atrophiant les bourgeons de croissance (1, figure 60). Sachant que la structure et la composition protéique des cellules en développement sont différentes de celle des cellules mères (Bartnicki-Garcia, 2002), ceci pourrait suggérer une certaine affinité de l'acide maslinique pour les cellules en croissance.

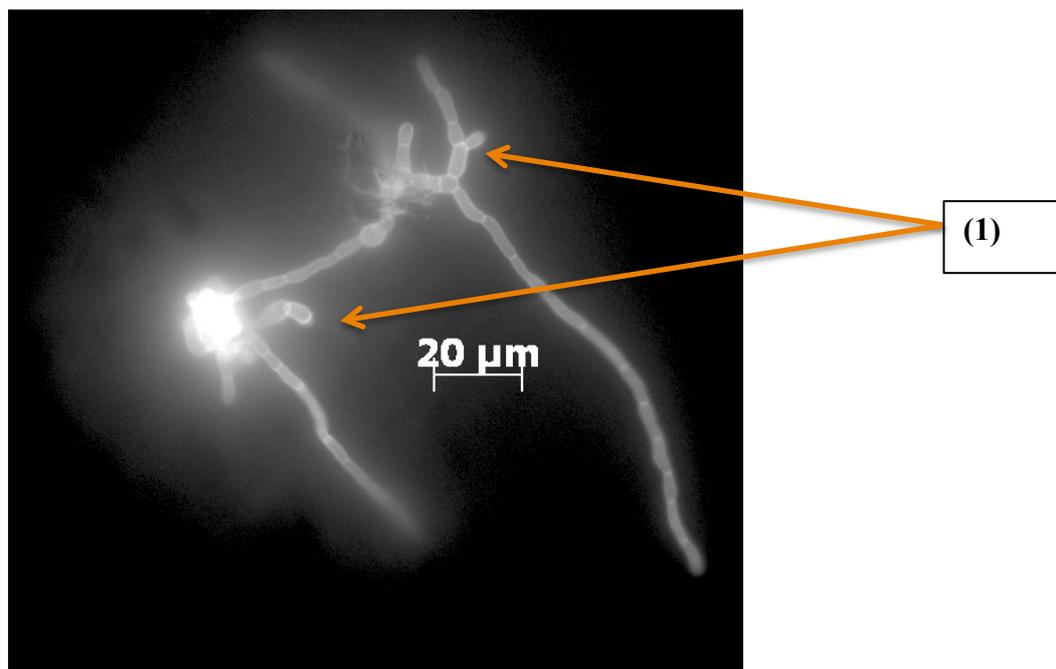


Figure 60 *T. rubrum* LMGO 4218 traité avec l'acide maslinique (HB-2) à 4 µg/mL (détail)

5.3 Etude de synergies

L'utilisation de produits en association pour le traitement de maladies fongiques est un des plus grands défis de la recherche clinique. En effet, l'association thérapeutique de composés peut conduire au développement de médicaments moins toxiques, induire des taux de succès plus élevés et diminuer l'apparition de résistances (Wingard et Leather, 2004).

Au niveau biomoléculaire, l'association bénéfique résulte d'une synergie (Barchiesi *et al.*, 2001). La synergie est un effet positif de complémentarité. C'est un phénomène influencé par divers facteurs qui agissent de manière combinée, créant un effet thérapeutique plus grand que la somme des effets attendus des composés opérant indépendamment (Chou, 2006).

Cet effet de synergie a été proposé comme étant un moyen de défense utilisé par les végétaux (Schultz et Nicholas, 2000). Selon cette étude, les métabolites possédant des propriétés fongicides agiraient en synergie avec les métabolites antioxydants. Ceci suggère que les métabolites secondaires des plantes protègent le bois d'une manière plus élaborée que la simple activité antifongique des composés. Ce phénomène pourrait aussi expliquer la perte d'activité parfois observée au cours du processus de fractionnement.

Afin de comprendre la fonction de protection du bois de ces métabolites secondaires isolés et de les valoriser pour une éventuelle application pharmaceutique, il a été conduit plusieurs études de synergie entre ces métabolites et des antimycotiques commerciaux.

5.3.1 Détermination de l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnée (ICIF)

Les études de synergie sont effectuées par la réalisation d'une *checkboard*, c'est-à-dire une plaque de 96 puits ou chaque puits reçoit un mélange de deux composés dans une concentration déterminée pour une souche de champignon (Meletiadis *et al.*, 2010). Le puits où se produit une inhibition de la croissance permet la détermination du couple de concentrations inhibitrices des deux composés (C_A et C_B) pour les composés A et B, respectivement. Pour chaque association, il est possible de calculer l'indice de concentration inhibitrice fractionnée (ICIF) selon la formule suivante :

$$ICIF (A, B) = \frac{C_A}{CIM_A} + \frac{C_B}{CIM_B}$$

Où CIM_A et CIM_B sont les concentrations inhibitrices minimales des composés A et B seuls. L'ICIF est alors déterminé pour chaque association inhibitrice, et le résultat peut être interprété selon :

- $ICIF \leq 0,5$, l'association est synergique
- $0,5 < ICIF \leq 4$, l'association ne présente pas d'interaction, et l'inhibition résulte seulement de l'additivité des deux composés
- $ICIF > 4$, l'association est antagoniste, les deux composés s'opposent

En outre, chaque concentration en association (C_A et C_B) peut être reportée sous forme de coordonnées sur un graphique appelé isobogramme. La courbe obtenue représente visuellement le type d'interaction qui se produit entre A et B (Figure 61) :

- Courbe convexe, l'interaction est synergique
- Droite, il n'y a pas d'interaction
- Courbe concave, l'interaction est antagoniste

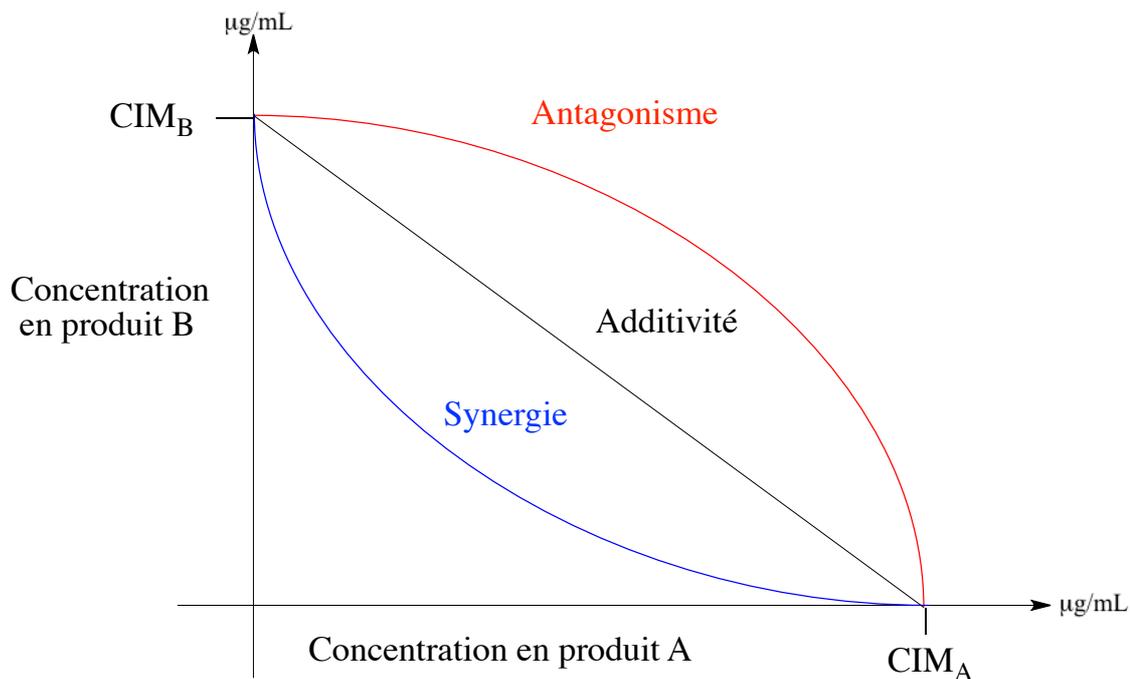


Figure 61 Représentation d'un isobogramme

5.3.2 Etude d'une combinaison impliquant l'acide maslinique (HB-2) et l'itraconazole

L'acide maslinique a présenté une activité modérée sur les champignons dermatophytes. Son interaction avec l'itraconazole sur ces mêmes champignons a été étudiée, et il a été observé une action synergique sur *M. gypseum* LMGO 10. Les concentrations inhibitrices minimales ($\mu\text{g/mL}$) en associations sont présentées dans le tableau 21 :

Tableau 21 Indice de concentration inhibitrice fractionnée (ICIF) de l'acide maslinique avec l'itraconazole sur *M. gypseum* LMGO 10

	$C_{\text{Ac. maslinique}}$	$C_{\text{itraconazole}}$	ICIF
$\text{CIM}_{\text{Ac. maslinique}}$	16	0	
	8	0,016	0,56
	4	0,032	0,38^a
	2	0,032	0,25
	1	0,063	0,31
	0,5	0,063	0,31
	0,25	0,125	0,52
$\text{CIM}_{\text{itraconazole}}$	0	0,250	

^a les valeurs en gras sont des associations synergiques ($\text{ICIF} \leq 0,5$)

On peut observer au premier abord que les associations ($C_{Ac. \text{ maslinique}}; C_{\text{itraconazole}} = (2,0 ; 0,032)$, $(1,0 ; 0,063)$ et $(0,5 ; 0,063)$ sont des combinaisons pour lesquelles une action synergique entre l'acide maslinique et l'itraconazole a pu être observée. Ces couples d'associations permettent d'obtenir une inhibition de la croissance fongique pour des concentrations 2 à 4 fois plus faibles que l'itraconazole utilisé seul. Cette synergie peut être visualisée sur l'isobogramme de la figure 62 :

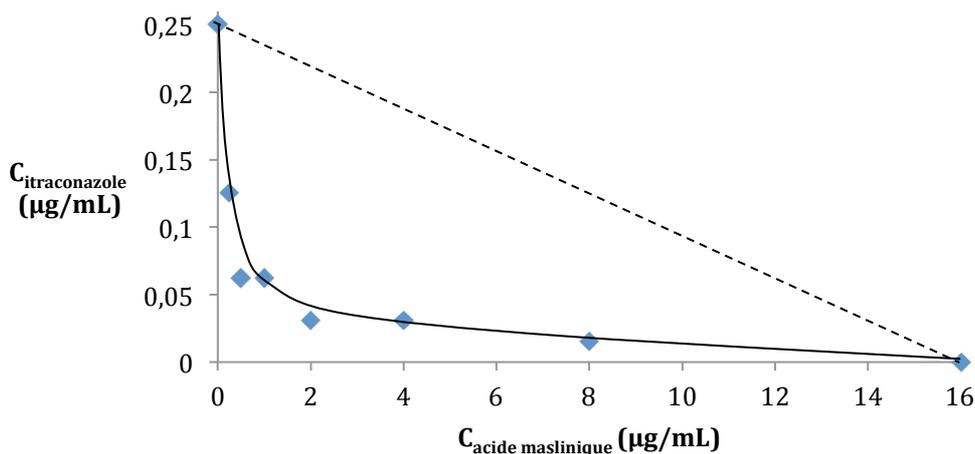


Figure 62 Isobogramme de l'acide maslinique en association avec l'itraconazole sur le champignon dermatophyte *M. gypseum* LMGO 10

La forme convexe de la courbe indique bien une synergie d'action entre l'acide maslinique et l'itraconazole. Toutefois, ce cas de synergie est l'unique cas obtenu pour tous les champignons testés. Il est donc difficile d'affirmer que l'association entre l'itraconazole et l'acide maslinique pourrait apporter un bénéfice thérapeutique, et plus encore d'expliquer cette synergie.

5.3.3 Etude d'une combinaison impliquant la bergénine (HB-1) et le fluconazole

La bergénine a présenté d'importantes associations synergiques avec le fluconazole sur les levures testées : *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Tableau 22), *C. albicans* ATCC 10231 (Tableau 23), *C. albicans* LMGO 102 (Tableau 24) et *C. glabrata* LMGO 44 (Tableau 25). Les concentrations inhibitrices minimales ($\mu\text{g/mL}$) en associations sont présentées dans les tableaux suivants :

Tableau 22 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur *C. parapsilosis* ATCC 22019

	C_{Berg}^*	C_{Flu}	ICIF
CIM _{Berg}	8	0	
	8	0,032	1,01
	4	0,063	0,52
	4	0,125	0,53
	4	0,25	0,56
	4	0,5	0,63
	2	1	0,50^a
	1	1	0,38
	0,5	1	0,31
	0,25	2	0,53
CIM _{Flu}	0	4	

Tableau 23 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur *C. albicans* ATCC 10231

	C_{Berg}	C_{Flu}	ICIF
CIM _{Berg}	8	0	
	8	0,032	1,00
	8	0,063	1,01
	8	0,125	1,02
	8	0,25	1,03
	8	0,5	1,06
	4	1	0,63
	1	2	0,38
	0,5	2	0,31
	0,25	4	0,53
CIM _{Flu}	0	8	

Tableau 24 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur *C. albicans* LMGO 102

	C_{Berg}	C_{Flu}	ICIF
CIM _{Berg}	8	0	
	8	0,125	1,00
	4	0,25	0,50
	4	0,5	0,50
	2	1	0,25
	2	2	0,25
	2	4	0,26
	2	8	0,27
	2	16	0,28
	1	32	0,19
CIM _{Flu}	1	64	0,25
	0	512	

Tableau 25 ICIF de la bergénine en association avec le fluconazole sur *C. glabrata* LMGO 44

	C_{Berg}	C_{Flu}	ICIF
CIM _{Berg}	32	0	
	16	1	0,63
	8	1	0,38
	8	2	0,50
	8	4	0,75
	4	8	1,13
CIM _{Flu}	0	8	

^a les valeurs en gras sont des associations synergiques ($FICI \leq 0,5$) ; * Flu : Fluconazole ; Berg : Bergénine

Pour les souches susceptibles au fluconazole *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 10231, il se produit une inhibition de la croissance avec des concentrations en bergénine de 0,5 à 1 µg/mL et en fluconazole de 1 à 2 µg/mL, soit des concentrations 4 à 16 fois plus faibles que celle de chaque composé isolé permettant d'obtenir la même inhibition. De même, il est possible d'observer des associations synergiques sur *C. glabrata* LMGO 44 pour des concentrations en bergénine 4 fois plus faibles que sa concentration inhibitrice minimale, et 4 à 8 fois plus faibles que les valeurs de CIM du fluconazole seul. Dans le cas de la souche résistante au fluconazole *C. albicans* LMGO

102, presque toutes les associations sont synergiques. Cette forte synergie peut être visualisée par l'isobologramme de la figure 63 :

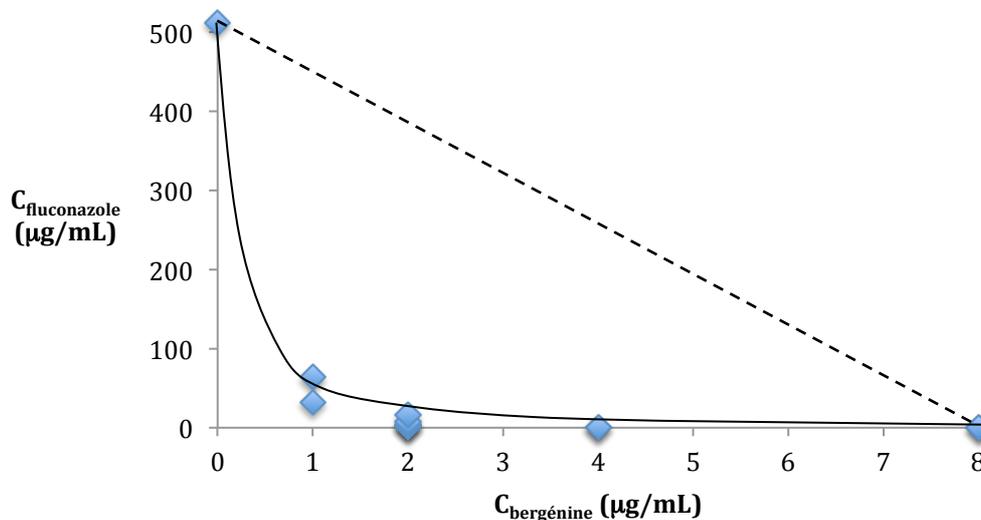


Figure 63 Isobologramme de la bergénine en association avec le fluconazole sur *C. albicans* LMGO 102

Il peut être observé une courbe convexe dans cette représentation graphique, typique d'une association synergétique. Dans le cas de cette souche, il est très intéressant de remarquer que l'association de la bergénine et du fluconazole permet de diminuer les valeurs de CIM par 4 à 512.

La résistance fongique aux azoles peut se produire par une modification de la cible médicamenteuse, qui dans le cas du fluconazole est l'enzyme C14- α -déméthylase responsable de la conversion du lanostérol en ergostérol, ou bien par une augmentation de l'efflux cellulaire ou encore par diminution de la perméabilité membranaire (Ghannoum et Rice, 1999). En outre, il est connu que les composés polyhydroxylés comme la bergénine sont généralement capables d'altérer l'intégrité de la membrane (Cushnie et Lamb, 2005), en provoquant une fluidification de sa structure et d'augmenter sa perméabilité, phénomène que nous avons d'ailleurs pu observer par microscopie avec la gnétine E (Partie 5, p. 125). Ainsi, une hypothèse du mécanisme d'action de la synergie bergénine/fluconazole serait que la bergénine faciliterait la pénétration du fluconazole à l'intérieur de la cellule fongique.

5.4 Tests d'interactions avec l'ergostérol

L'ergostérol est un constituant de la membrane fongique nécessaire au maintien de sa perméabilité et de sa fluidité. Il est absent des cellules animales, où le cholestérol joue ce rôle de

maintien. L'ergostérol est ainsi une cible privilégiée des thérapeutiques antifongiques. L'amphotéricine B est un exemple de médicament interagissant avec l'ergostérol, formant des complexes avec celui-ci et se fixant dans la membrane plasmique du champignon, en provoquant une altération de la perméabilité de la membrane, une perte des constituants cytoplasmiques et la mort de la cellule (Ellis, 2002).

Afin de mieux comprendre le mode d'action des composés antifongiques isolés dans ces travaux, il a été conduit des essais visant à déterminer si ceux-ci présentaient une affinité pour l'ergostérol. Ce test consiste en un simple ajout d'ergostérol exogène en concentrations variables au cours d'un test de microdilution classique. Si une augmentation de la valeur de la concentration inhibitrice est observée pour une augmentation concomitante de la concentration en ergostérol exogène, cela signifie que le composé présente une certaine affinité pour l'ergostérol (Escalante *et al.*, 2008) et que son activité est donc moindre lorsque la teneur en ergostérol dans le milieu est plus grande.

Les tests ont été conduits sur *C. albicans* ATCC 10231 en utilisant l'amphotéricine B comme contrôle positif. Il est exprimé un facteur multiplicatif du CIM, noté x CIM, qui est le résultat du rapport $CIM_{\text{avec ergostérol exogène}}/CIM_{\text{en conditions normales}}$. Ce rapport permet d'apprécier rapidement l'influence de l'ergostérol sur la valeur du CIM en observant par combien elle est multipliée. Dans le cas-contrôle, les résultats sont présentés dans le tableau 26 :

Tableau 26 Test d'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol sur *C. albicans* ATCC 10231

[Ergosterol] en µg/mL	CIM_{AMB}	x CIM
0	0,0625	1
50	0,0625	1
100	0,125	2
150	0,25	4
200	0,5	8
250	0,5	8

[Ergostérol] : Concentration en ergostérol exogène ; CIM_{AMB} : Concentration inhibitrice minimale obtenue pour la concentration en ergostérol exogène ajoutée

Il peut alors être observé que l'amphotéricine B présente une certaine affinité pour l'ergostérol ajouté au cours de la réalisation du test, puisque la valeur de CIM de l'amphotéricine B est multipliée. En effet, celle-ci va se complexer à l'ergostérol exogène présent en grande quantité dans le puits test, la détournant de l'ergostérol membranaire du champignon dont la croissance n'est alors plus inhibée.

Ce même test a été effectué avec la bergénine (**HB-1**), le picéatannol (**SP-5**) et la gnétine E (**SP-8**), tous présentant de fortes activités sur *C. albicans* ATCC 10231. Une représentation des résultats ci-dessous (Figure 64) permet de visualiser l'effet de l'ergostérol sur le CIM de chacun de ces composés, par comparaison avec l'amphotéricine B :

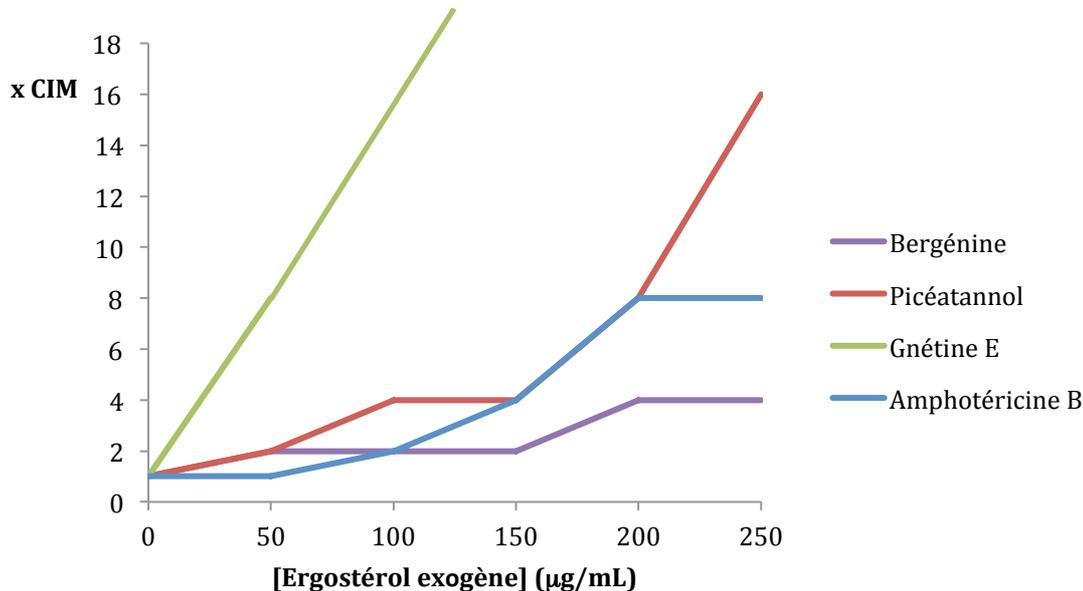


Figure 64 Effet de différentes concentrations d'ergostérol exogène (50-250 µg/mL) sur le CIM de l'amphotéricine B, du picéatannol (SP-5), de la gnétine E (SP-8) et de la bergénine (HB-1) pour *C. albicans* ATCC 10231

On peut donc retrouver l'effet de l'ergostérol exogène sur la concentration inhibitrice minimale de l'amphotéricine B, avec une augmentation de sa valeur lorsque la concentration en ergostérol exogène augmente.

Dans le cas de la bergénine, on observe une légère augmentation du CIM, augmentation qui reste toutefois inférieure à celle de l'amphotéricine B. Le picéatannol semble avoir une forte affinité pour l'ergostérol, et plus encore la gnétine E dont le CIM a augmenté en dehors de la gamme de concentration testée. Ces deux derniers composés semblent donc avoir une forte affinité pour l'ergostérol, ce qui pourrait expliquer leur activité antifongique.

En effet, à l'instar de l'amphotéricine B, le picéatannol et la gnétine E pourraient interagir avec l'ergostérol de la membrane fongique provoquant une rupture de la pression osmotique, en ouvrant les canaux transmembranaires conduisant à la mort cellulaire (Baginski et Czub, 2009). Il n'existe pas à notre connaissance d'étude relatant la formation de complexes stilbènes – ergostérol membranaire pouvant expliquer la fongitoxicité de ces composés. Toutefois, il est fort probable qu'un composé comme la gnétine E, au vu de son poids moléculaire élevé, sa multiple

hydroxylation et ses nombreux sites d'interactions par liaison hydrogène et Van der Waals, puisse former des complexes de plusieurs unités autour de l'ergostérol (Spencer *et al.*, 1988), mais également autour de protéines membranaires, provoquant ainsi la mort cellulaire.

5.5 Concentration fongicide minimale (CFM)

Lors de tests de microdilution effectués sur les dermatophytes et levures en accord avec les normes publiées par le CLSI, la valeur observée (CIM) reflète seulement la concentration minimale capable d'inhiber la croissance du champignon. En revanche, la concentration nécessaire à tuer le champignon pathogène peut être bien supérieure à la concentration d'inhibition, comme c'est le cas pour la griséofulvine (Baran *et al.*, 2005). En fait, la capacité fongicide d'un composé est liée à son mode d'action et à la capacité qu'a le champignon à métaboliser plus ou moins rapidement le composé (Lewis, 2007). Dans le cas de cette étude, il était alors intéressant de savoir si les composés isolés possédaient des propriétés fongicides, pouvant tuer la cellule fongique, ou seulement fongistatiques, se limitant à une inhibition de la croissance.

Dans ces expériences, l'activité fongicide a été évaluée sur les levures *C. albicans* ATCC 10231 et *C. parapsilosis* ATCC 22019 en présence de bergénine (**HB-1**), picéatannol (**SP-5**), gnétine E (**SP-8**), latifolol (**SP-9**) et (+)-mopanol (**P-1**), ainsi que pour les contrôles positifs itraconazole, fluconazole et l'amphotéricine B, tous 3 réputés pour être fongicides (Cantón *et al.*, 2003 ; Majoros et Kardos, 2008). Les résultats sont présentés dans le tableau 27.

Tableau 27 Valeur de CIM et de CFM pour les composés isolés et les contrôles positifs sur *C. albicans* ATCC 10231 et *C. parapsilosis* ATCC 22019

Composé	<i>C. albicans</i> ATCC 10231			<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
Bergénine (HB-1)	4	256	64	4	64	16
Picéatannol (SP-5)	1	8	8	0,5	8	16
Gnétine E (SP-8)	8	8	1	8	8	1
Latifolol (SP-9)	1	16	16	1	32	32
(+)-Mopanol (P-1)	2	>128	>64	1	>128	>128
Fluconazole	2	4	2	2	2	1
Itraconazole	0,5	0,5	1	0,25	0,25	1
Amphotéricine B	2	2	1	2	2	1

Comme il est décrit dans la littérature, les contrôles positifs sont en effet fongicides sur les levures testées, avec un rapport CFM/CIM compris entre 1 et 2. Des 5 composés testés, seule la gnétine E est fongicide à sa concentration inhibitrice, alors que d'un autre côté le (+)-mopanol, qui

est le composé présentant la meilleure activité sur les levures au cours des tests CIM ne possède aucune propriété fongicide (Rapport MFC/CIM > 64). De même, la bergénine n'a pas présenté d'activité fongicide marquée.

Etonnamment le latifolol et le picéatannol, qui possèdent une meilleure activité fongistatique que la gnétine E sur ces levures, présentent une concentration fongicide semblable, voir supérieure dans le cas du latifolol, à celle de la gnétine E. Ceci pourrait s'expliquer par une différence de vitesse de métabolisation par la cellule fongique de chacun de ces composés (Jeandet *et al.*, 2010), mais le mécanisme de métabolisation des stilbènes et leurs dérivés par le genre *Candida* spp. est encore très mal connu.

5.6 Conclusions

A ce niveau du travail, il n'a pas été possible de déterminer avec certitude les mécanismes d'action des composés antifongiques isolés. Toutefois, quelques points ont pu être éclaircis et il nous est possible d'évoquer certaines hypothèses relatives à leurs modes d'actions.

Le mopanol qui semblait être un composé possédant de fortes capacités antifongiques sur les levures semble relativement inefficace à les tuer. Sa toxicité prononcée sur les cellules animales et ses seules capacités fongistatiques nous permettent d'écarter ce composé des candidats potentiels au développement d'un produit antimycotique.

L'acide maslinique est un composé moyennement toxique pour les dermatophytes, alors qu'il ne l'est pas du tout pour les levures. Il semble agir par perturbation de la structure de l'enveloppe cellulaire des dermatophytes, conduisant à une altération profonde de son intégrité et de sa perméabilité.

Il peut être avancé avec plus de certitude que cet effet délétère sur l'enveloppe cellulaire fongique est le mode d'action privilégié de la gnétine E. Celle-ci semble avoir la capacité de se lier entre autres à l'ergostérol membranaire, provoquant ainsi de profondes modifications de l'architecture de la membrane. Ces altérations conduisent probablement à de fortes perturbations de la perméabilité de la cellule fongique, induisant la mort cellulaire. Malheureusement, cette action n'est pas spécifique de la cellule fongique et la gnétine E est généralement toxique sur les 2 lignées cellulaires humaines utilisées dans notre étude.

Le latifolol et le picéatannol agissent probablement par les mêmes voies que la gnétine E, tout en ayant une toxicité sur les cellules animales plus faible, mais en ayant des capacités fongicides également plus faibles.

D'une manière analogue, la bergénine pourrait altérer la structure de l'enveloppe cellulaire. Toutefois, le mode d'action de cette altération reste ambigu, puisque ce composé n'a pas d'affinité prononcée pour l'ergostérol, mais semble tout de même diminuer la perméabilité de la membrane. Ce composé fongistatique des levures, faciliterait en effet le passage du fluconazole et potentialise son activité. L'absence de toxicité de la bergénine envers les cellules animales et ses aptitudes à agir en synergie avec le fluconazole pourraient faire de la bergénine un candidat de choix pour des études de traitements anticandidaux en association.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectifs de valoriser les métabolites secondaires issus d'espèces amazoniennes spécialisant un bois résistant à la dégradation fongique. Il a été proposé à travers cette étude d'isoler, d'identifier et d'évaluer l'activité antifongique de composés provenant d'espèces durables sélectionnées, puis d'analyser et de comprendre les modes d'actions de ces composés pour *in fine* proposer une application pharmaceutique pour le traitement d'affections fongiques humaines.

La sélection bio-inspirée d'espèces a permis de choisir des arbres prometteurs parmi les milliers d'espèces végétales existantes en forêt amazonienne. Ainsi, il a été possible de démontrer la relation entre la durabilité naturelle d'un bois et les capacités antifongiques des extraits et des composés que l'arbre contient. En effet, plus un bois est résistant à la dégradation fongique, plus élevée est la probabilité que ce bois produise des métabolites secondaires antifongiques. En outre, ces mêmes métabolites secondaires sont actifs aussi bien sur les champignons dégradants du bois que sur les champignons pathogènes humains.

Il a été sélectionné 4 espèces afin de conduire un isolement bioguidé des composés responsables de l'activité antifongique. Ces espèces sont *Humiria balsamifera* (Humiriaceae), *Peltogyne* sp. (Leguminosae – Caesalpinioideae), *Spirotropis longifolia* (Leguminosae – Papilionoideae) et *Unonopsis rufescens* (Annonaceae), tous possédant une résistance exceptionnelle à la dégradation fongique. Le processus de fractionnement a permis d'isoler et de caractériser 21 molécules, dont 4 inédites (les spirotropines A, B et C et la spirotropone), 3 nouvelles pour la famille des Leguminosae – Papilionoideae (les gnétines D, E et le latifolol) et 7 composés (acide maslinique, bergénine, (+)-mopanol, picéatannol, gnétines D et E) avec des activités antifongiques notables.

Des études microbiologiques préliminaires et une évaluation de la cytotoxicité de ces composés ont permis de clarifier leurs modes d'actions. D'une manière générale, tous ces composés semblent agir par altération plus ou moins marquée de l'enveloppe cellulaire fongique et animale, les rendant impropres au développement de thérapies antifongiques. Toutefois, la bergénine, isolée de *Humiria balsamifera*, a montré un bon potentiel pour le développement d'un traitement antifongique en association avec le fluconazole. Le picéatannol, isolé de *Spirotropis longifolia*, est un composé

également remarquable pour avoir présenté de bonnes activités anticandidales associées à de faibles toxicités sur les cellules humaines testées.

Cependant, de nombreuses études sont encore nécessaires pour affiner nos conclusions. Le fluconazole est une thérapie utilisée *per os* particulièrement dans le traitement de candidoses invasives (Mathew et Nath, 2009), or la bergénine comme le picéatannol présentent une faible biodisponibilité (Asensi *et al.*, 2002 ; Qin *et al.*, 2010). Il faudrait alors envisager l'étude d'une association de ces deux composés avec des imidazoles tels que le clotrimazole, le miconazole, l'éconazole ou le cétoconazole ou bien encore par des allylamines comme la terbinafine (Hay, 2009), médicaments utilisés pour le traitement topique de candidoses muco-cutanées.

Enfin, il faudra aussi dans une étude ultérieure s'attacher à caractériser les composés responsables de l'activité antifongiques des extraits méthanoliques des bois de *Licaria guianensis* et de *Zygia racemosa*.

PARTIE 6. MATERIELS ET METHODES

6.1 Contexte et lieux des travaux de recherche

Ces travaux se sont déroulés dans le cadre d'une coopération scientifique entre l'UMR ECOFOG (Guyane française), le laboratoire de pharmacognosie de l'université de Brasília (Brésil) et l'ICSN (France métropolitaine).

L'UMR ECOFOG, Ecologie des Forêts de Guyane, regroupe des moyens d'Agroparistech, de l'INRA, du CIRAD, du CNRS et de l'Université des Antilles et de la Guyane sur quatre sites : le campus agronomique de Kourou, le Pôle Universitaire Guyanais à Cayenne, le laboratoire de sciences du bois de Pariacabo à Kourou et le dispositif expérimental de Paracou à Sinnamary. Pour ses travaux de recherches sur la forêt guyanaise, l'unité fait partie du Laboratoire d'Excellence Centre d'Études de la Biodiversité Amazonienne.

Les travaux de collectes, d'identification botanique, d'isolement, d'expériences RMN, d'observations microscopiques et d'évaluation de l'activité antifongique étaient basés au L3MA, Laboratoire des Molécules et Matériaux en Milieu Amazonien, UMR ECOFOG.

Le laboratoire de pharmacognosie de l'université de Brasília est enregistré auprès du CNPq (Centre National de Recherche au Brésil) sous le nom Biofármacos. Ce groupe de recherche s'intéresse à la découverte de substances antifongiques et anti-leishmaniennes issus de plantes du Cerrado, biome environnant de Brasília.

Les travaux d'évaluation des activités antifongiques ont été poursuivis au sein de ce laboratoire, ainsi que les études de synergies, d'association avec l'ergostérol et d'activités fongicides. Les spectres de masses basses résolutions et hautes résolutions ont été effectués au laboratoire de chimie de la Faculté de sciences pharmaceutiques de Ribeirão Preto (FCFRP, USP) – São Paulo, Brésil.

Les équipes de l'ICSN, Institut de Chimie des Substances naturelles (CNRS, Centre National de la Recherche Scientifique), poursuivent des recherches qui se rattachent à quatre domaines : la Chimie organique des molécules complexes, les produits naturels et la chimie médicinale, la chimie et la biologie structurales, la chimie et la biologie de cibles thérapeutiques. Ce pôle de recherche est situé à Gif-sur-Yvette.

Dans ce laboratoire, ont été effectuées les analyses chimiques de pouvoirs rotatoires, spectres infra-rouges et ultra-violet et de dichroïsme circulaire. Les évaluations de cytotoxicité sur les lignées cellulaires KB, MRC5 et MDA-MB-435 ont également été effectuées à l'ICSN.

6.2 Généralités sur les matériels et méthodes

6.2.1 Matériels biologiques

Les souches des champignons lignivores ont été maintenues sur milieu de culture solide préparé à partir d'extrait de malt (Bioblock, 40 g/L) et agar-agar (Bioblock, 20 g/L). Toutes les expériences ont été réalisées dans une hotte à flux laminaire verticale préalablement irradiée par lumière ultra-violette. Les souches de champignons pathogènes humains, dermatophytes et levures, ont été maintenues sur un milieu agar-patate dextrose (Bioblock, 39 g/L). Les tests de microdilution ont été réalisés en plaques de 96 puits à fond en « U ». Comme milieu de culture liquide, il a été utilisé le milieu synthétique RPMI 1640 (Bioblock, 8,4 g/L) avec de la +L-glutamine, sans bicarbonate et avec du rouge de phénol comme indicateur de pH.

Les souches utilisées pour les tests de cytotoxicité sont les lignées cellulaires KB (carcinome buccal), MDA-MB-435 (mélanome) et MRC5 (poumon foetal humain) issues de la Ciblethèque Cellulaire de l'ICSN, Gif-sur-Yvette, France.

6.2.2 Matériels chimiques

Pour les fractionnements il a été utilisé des chromatographies sur gel de silice (Merck® granulométrie 60 µm). Les solvants utilisés comme éluant furent l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle (VWR, qualité extraction et distillés), et le méthanol (VWR, qualité HPLC). Les chromatographies en couches minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice Merck® AL CCD 60F₂₅₄. Les plaques ont été révélées avec de l'acide phosphomolybdique à 5% m/vol dans l'éthanol. Les purifications par CCM préparatives ont été faites sur des plaques de silice Partisil® Merck 20 cm x 20 cm x 1000 µm, 60 µm. Les purifications par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont été effectuées avec un équipement Waters® (pompe Waters 600 et détecteur à absorption UV Waters 2487 à deux longueurs d'onde). Les chromatographies liquides hautes performances analytiques ont été réalisées avec un équipement Waters® (pompe Waters 600, détecteur à barrette de diode (DDA) 2996 et détecteur à diffusion de lumière ELSD Waters 2424). Il a été utilisé des colonnes de phase inverse C18 (Supelco C18 Discovery® 15 cm x 4,6

mm, 5 µm et pré-colonne correspondante) pour les analyses, et des colonnes inverses C18 préparatives (Supelco C18 Discovery® HS 15 cm x 21,2 mm, 5 µm et pré-colonne correspondante) pour les purifications. Des colonnes de polyamide (Chromabond®) ont été utilisées pour retirer les macromolécules et filtrer certains extraits.

6.2.3 Moyens analytiques

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été réalisés sur un appareil Varian® 400NMR équipé d'une sonde de détection inverse Auto X PGF ¹H/¹⁵N-³¹P de 5 mm. Les spectres protons ont été enregistrés à 400 MHz et les spectres du carbone à 100,6 MHz. Dans les descriptions des spectres RMN, s signifie singulet, d doublet, t triplet, q quadruplet, m multiplet, l signal large. Les constantes de couplages *J* sont exprimées en Hertz (Hz) et les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm (parties par millions) en prenant comme référence le déplacement chimique du tétraméthylsilane (TMS). Les rotations optiques des composés ont été mesurées avec un polarimètre Anton Paar® MCP 300 et les dichroïsmes circulaires ont été déterminés avec un spectromètre CD Jasco® J-810. Les spectres UV ont été réalisés avec un appareil Varian® CARY 100, les spectres infra-rouges avec un appareil FT-IR PerkinElmer® Spectrum 100 et les points de fusion ont été mesurés avec un appareil Büchi B-540. Les mesures HR-ESI-MS ont été obtenues avec un instrument quadripôle-time-of-flight (UltrOTOF-Q, Bruker® Daltonics, Billerica, MA).

6.2.4 Microscopie

Le microscope utilisé était un épimicroscope binoculaire Zeiss® Axio lab. A1, équipé d'une lampe à mercure, d'un filtre Zeiss® Set 01 (Excitation 365 nm, émission 397 nm). Les images ont été enregistrées sous un agrandissement de 40×. Le colorant utilisé était le Calcofluor White M2R (Flucka, 1 g/L). Les images ont été traitées par le programme AxioVision.

6.2.5 Traitements statistiques

L'influence de la classe de durabilité des espèces sur l'activité antifongique des extraits a été analysée par le test du χ^2 de Pearson. L'homogénéité des valeurs de CIM obtenues pour les 3 catégories de champignons (dermatophytes, levures et lignivores) a été analysée par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les valeurs de CIM ont été rangées selon $R_1 = 3,9 \mu\text{g/mL}$, $R_2 = 7,8 \mu\text{g/mL}$, $R_3 = 15,6 \mu\text{g/mL}$, $R_4 = 31,25 \mu\text{g/mL}$, $R_5 = 62,5 \mu\text{g/mL}$, $R_6 = 125 \mu\text{g/mL}$, $R_7 = 250 \mu\text{g/mL}$ et $R_8 \geq 500 \mu\text{g/mL}$. Pour les deux tests, $p < 0,01$ a été considéré comme significatif (Statistical Package for the Social Sciences SPSS-16).

6.2.6 Modélisations moléculaires

La modélisation tridimensionnelle de la spirotropine A a été effectuée par un calcul de mécanique moléculaire utilisant un champ de force MM2 (Chem3D, Chemoffice ultra 12.0, CambridgeSoft).

6.3 Matériel végétal et extraction

6.3.1 Collecte et identification des plantes

Trois séries de collectes de plantes ont eu lieu ; en octobre 2008, avril 2009 et septembre 2009. Les extraits de *Brosimum guianensis* et de *Peltogyne* sp. étaient déjà disponibles dans la banque d'extraits du groupe de recherche du L3MA – Cayenne, Guyane.

Lors de la première collecte, ont été récoltées en quantité préparative (quelques dizaines de kg) les espèces *Erisma uncinatum*, *Licaria guianensis* et *Unonopsis rufescens*. Cette collecte a été réalisée dans une parcelle d'exploitation forestière administrée par l'ONF de la commune de Régina – Guyane française.

A la seconde collecte, ont été récoltées les espèces *Balizia pedicellaris*, *Enterolobium schomburgkii*, *Glycydendron amazonicum*, *Hymenolobium flavum*, *Inga alba*, *Lecythis idatimon*, *Manilkara huberi*, *Micropholis guianensis* et *Zygia racemosa* en quantité analytique (quelques centaines de grammes) et *Spirotropis longifolia* en quantité préparative. Cette collecte a été réalisée sur le layon « Plantes médicinales », parcelle d'exploration scientifique de l'IRD, Sinnamary – Guyane française. Cette parcelle compte environ 500 arbres identifiés et référencés dont l'abattage est contrôlé, mais pouvant néanmoins être prélevé en quantité limitée.

Lors de la troisième collecte, *Humiria balsmifera* a pu être récolté en quantité préparative dans un terrain privé de la commune de Macouria – Guyane.

Pour chaque espèce – hormis celles collectées à la parcelle de l'IRD et déjà déposées – a été réalisée une planche d'herbier (exsiccata) déposée à l'herbier de Guyane – IRD (CAY). Les identifications des espèces ont été vérifiées par les Dres Sophie Gonzales et Marie-Françoise Prévost. Les divers organes ont ensuite été séparés, séchés en salle climatisée pendant deux semaines puis pulvérisés avec un broyeur à couteaux.

6.3.2 Extraction

Pour le criblage préliminaire, les extractions ont été faites à partir de 300 g de broyat de chacun des organes étudiés par macérations successives à l'acétate d'éthyle (3 x 500 mL) et au méthanol (2 x 500 mL) pendant 48 heures. Les solutions extractives ont été récupérées par filtrations puis évaporées sous pression réduite à 30°C. Les extraits obtenus ont été stockés dans des piluliers et maintenus à 2°C.

Pour le fractionnement, le broyat du matériel végétal (3-10 kg) de chaque plante sélectionnée a été extrait à l'acétate d'éthyle et au méthanol (3-10 L, deux fois) par macération à température ambiante durant 24h. L'évaporation des solutions extractives a été réalisée dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Les rendements d'extractions sont exposés dans le tableau 2, p. 69.

6.4 Evaluation de l'activité antifongique

6.4.1 Champignons lignivores

Deux microorganismes ont été utilisés : *Pycnoporus sanguineus* et *Trametes versicolor*, cédés par l'unité de recherche UR 40 du CIRAD, équipe Bois tropicaux – Montpellier, France. Pour réaliser les tests, une sous-culture de chaque souche a été maintenue dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture stérile et incubée pendant au moins deux semaines. L'activité des extraits a été évaluée sur ces champignons par perforation en agar et microdilution en milieu liquide.

6.4.2 Champignons pathogènes humains

Les souches ATCC et les isolats cliniques ont été cédés par le Laboratoire de Mycologie de l'Université de Goiás (LMGO) – Brésil. Ces souches sont les champignons dermatophytes *Microsporum gypseum* (*M.g.* LMGO 10 et *M.g.* LMGO 533), *Microsporum canis* (*M.c.* LMGO 02 et *M.c.* LMGO 25), *Trichophyton rubrum* (*T.r.* LMGO 06, *T.r.* LMGO 08 et *T.r.* LMGO 4218) et *Trichophyton mentagrophytes* (*T.m.* LMGO 09), ainsi que les levures *Candida albicans* (*C.a.* ATCC 10231 et *C.a.* LMGO 102), *Candida parapsilosis* (*C.p.* ATCC 22019 et *C.p.* LMGO 05), *Candida glabrata* (*C.g.* LMGO 44), *Candida krusei* (*C.k.* LMGO 174), *Candida tropicalis* (*C.t.* LMGO 35) et *Cryptococcus gattii* (*C.g.* LMGO L1). Les isolats cliniques proviennent de patients de l'hôpital de l'Université. Pour réaliser les tests, une sous-culture de chaque souche a été maintenue

dans un tube à essai contenant le milieu de culture stérile et incubée avant les tests pendant au moins 2 jours pour les levures et 5 jours pour les dermatophytes. L'activité des extraits sur ces champignons a été évaluée par deux méthodes : le test de perforation en agar et celui de microdilution en milieu liquide.

6.4.3 Test de perforation en agar

Afin de mesurer la sensibilité des souches de champignons lignivores ou pathogènes humains en présence des extraits, il a été utilisé une version légèrement modifiée de la méthode de perforation décrite par Karou *et al.* (2006).

Les solutions de milieu de culture ont été préparées avec de l'eau distillée et, selon la souche utilisée, avec un mélange extrait de malt/agar pour les champignons lignivores ou dextrose de pomme de terre/agar pour les champignons dermatophytes. Ces solutions ont été ensuite stérilisées en autoclave (20 min, 121°C) et distribuées dans des boîtes de Pétri de 14 cm de diamètre (50 mL de milieu de culture par boîte).

Ensuite, une suspension de mycélium de chaque souche a été préparée en versant 100 µL d'eau distillée stérile directement sur la surface gélosée d'une boîte de Pétriensemencée. Le milieu est alors délicatement frotté de façon à mettre en suspension les parties visibles des mycéliums dans l'eau stérile. Chaque suspension a été ajustée au standard de turbidité McFarland 2, puis distribuée de façon homogène sur toute la surface d'une boîte de Pétri de 140 mm de diamètre contenant le milieu de culture pur et stérile. L'excès d'eau des suspensions a été évaporé sous la hotte. Cinq cavités de 6 mm de diamètre ont été perforées à l'aide d'une canule en verre stérile sur les milieux de cultureensemencés. Dans la cavité centrale de chaque boîte ont été déposés 50 µL de DMSO stérile pur, ce dernier étant utilisé comme contrôle négatif de nos essais.

Les extraits à tester ont été dilués dans du DMSO stérile afin d'obtenir une concentration de 100 mg/mL. Cette solution (50 µL) a été déposée dans les cavités des boîtesensemencées puis toutes les boîtes ont été incubées à 32°C jusqu'à ce que la croissance fongique permette de mesurer visuellement une zone d'inhibition de croissance autour de chaque cavité. L'activité antifongique de chaque extrait a été évaluée en fonction de la présence ou de l'absence de halos d'inhibition de la croissance. Ces halos ont été mesurés avec une règle millimétrée dans 4 directions, considérant comme mesure finale le plus petit diamètre. Chaque extrait a été testé en duplicata.

6.4.4 Test de microdilution

Le test de microdilution a pour objectif de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CIM) d'un extrait sur la croissance des souches de champignons lignivores, dermatophytes et levures en milieu liquide. La méthode utilisée a été adaptée des normes M38-A2 et M37-A3 du CLSI (CLSI, 2008a, b) selon des travaux antérieurs (Melo e Silva *et al.*, 2009).

La solution de milieu de culture RPMI a été tamponnée avec l'acide 3-(*N*-morpholino)-propane sulfonique (MOPS) dans une concentration de 0,165 mol/L pour atteindre un pH = 7,0. Le RPMI tamponné a ensuite été filtré dans une unité de filtration stérilisante équipée d'un filtre de 0,22 µm de porosité.

Les antifongiques utilisés comme contrôles positifs dans le test (itraconazole, fluconazole et amphotéricine B) ont été dilués successivement à partir d'une solution mère à 1,6 mg/mL afin d'obtenir une gamme de concentrations comprise entre 16 et 0,03 µg/mL (itraconazole) et 64 et 0,125 µg/mL (fluconazole et amphotéricine B).

Les extraits et les composés isolés ont été dilués dans du DMSO afin d'obtenir une solution à 100 mg/mL et 12,8 mg/mL respectivement. Cette solution a été diluée dans du RPMI stérile pour atteindre une gamme de concentrations entre 500 et 0,98 µg/mL pour les extraits et entre 64 et 0,125 mg/mL pour les composés isolés. Tous les essais ont été répétés deux fois en deux expérimentations distinctes. Les essais ayant donné des résultats différents ont été répétés jusqu'à obtenir une valeur fiable.

La solution mère de mycélium de chaque souche a été préparée par mise en suspension des parties visibles des mycéliums dans de l'eau stérile. Toutes les solutions mères ont été ajustées au standard de turbidité McFarland 2 pour ensuite être diluées dans une proportion de 1:10 (v/v, dermatophytes et lignivores) ou 1:1000 (v/v, levures) dans du RPMI stérile.

Les plaques de microdilutions contenant les extraits, les composés isolés et les molécules commerciales antifongiques ont été inoculées avec les solutions de mycélium (100 µL) et incubées à 32°C. Les résultats ont été observés après 5 jours pour les champignons dermatophytes et les lignivores, et après 2 jours pour les levures. Le CIM a été déterminé comme étant la concentration correspondante au dernier puits où la croissance fongique était absente.

6.5 Fractionnements

6.5.1 Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *H. balsamifera*

Cet extrait (10 g) a été fractionné par colonne ouverte sur silice (\varnothing 8 cm) par l'éluion de 1L d'hexane, 1L de dichlorométhane, 1L d'acétate d'éthyle, 1L d'éthanol puis 1L de méthanol. Après évaporation, cinq fractions ont été obtenues correspondant à chaque éluant : hexane (0,98 g ; F₁), dichlorométhane (0,65 g, F₂), acétate d'éthyle (0,21 g, F₃), éthanol (4,00 g, F₄) et méthanol (0,16 g, F₅). Les fractions obtenues à l'éthanol et au méthanol ont été séchées, reprises dans l'isopropanol et filtrées sur fritté afin de retirer la silice dissoute. Ce fractionnement a été effectué avec un rendement de 60%.

Les fractions ont été testées sur *C. albicans* ATCC 10231 par la méthode de microdilution, et la meilleure activité antifongique a été observée pour les fractions F₂ et F₄. L'extrait brut a été analysé par HPLC (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 80/20 à 0/100 en 25 min, figure 65).

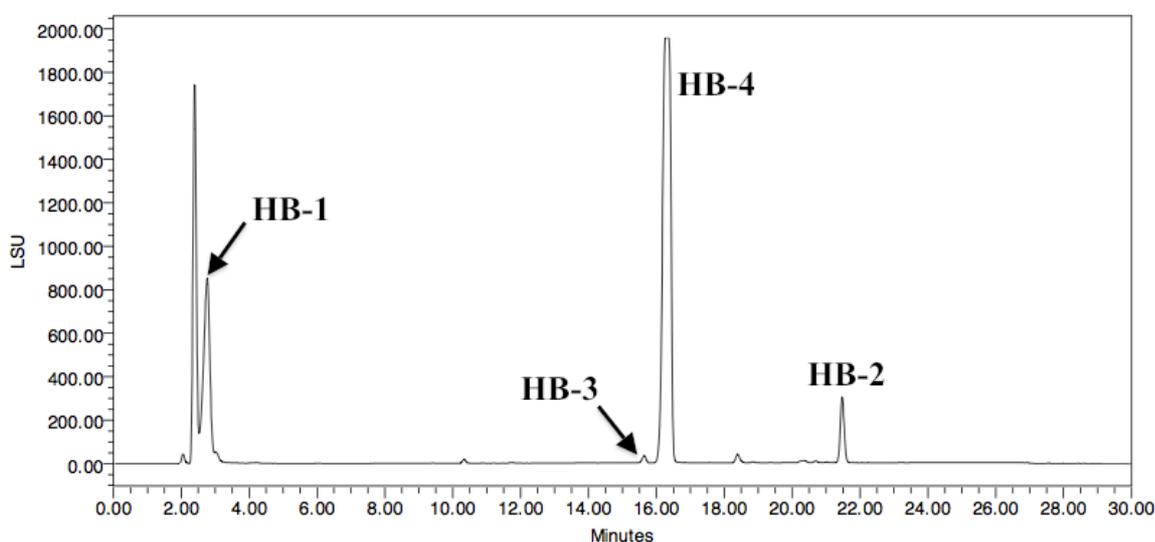


Figure 65 Chromatogramme (ELSD) de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *H. balsamifera*

6.5.1.1 Etude de la fraction F₂

Cette fraction (650 mg) a été refractionnée par chromatographie sur colonne de silice (\varnothing 3,2 cm) avec un gradient Hexane/AcOEt : 1/0 jusqu'à 0/1. Vingt et une sous-fractions ont été obtenues (F_{2-A} à F_{2-U}) avec un rendement proche de 90%. La fraction F_{2-P} était la seule à présenter une

activité antifongique avec une valeur de CIM de 31,3 $\mu\text{g/mL}$ sur la souche *C. albicans* ATCC 10231.

6.5.1.2 Purification de la fraction F_{2-P}

100 mg de cette sous-fraction ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 80/20 à 0/100 en 20 min). Une fraction pure a été obtenue, identifiée par la suite comme étant l'acide maslinique (**HB-2**, 60 mg, 90 ppm). Un chromatogramme de la fraction F_{2-P} peut être visualisé sur la figure 66 (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 40/60 à 0/100 en 25 min).

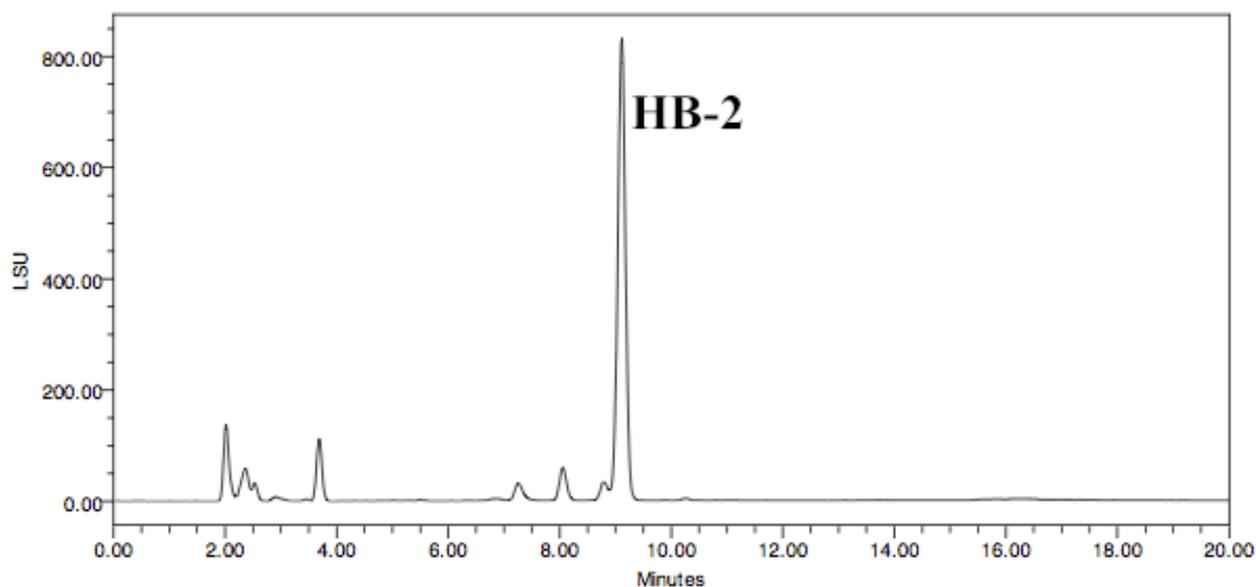
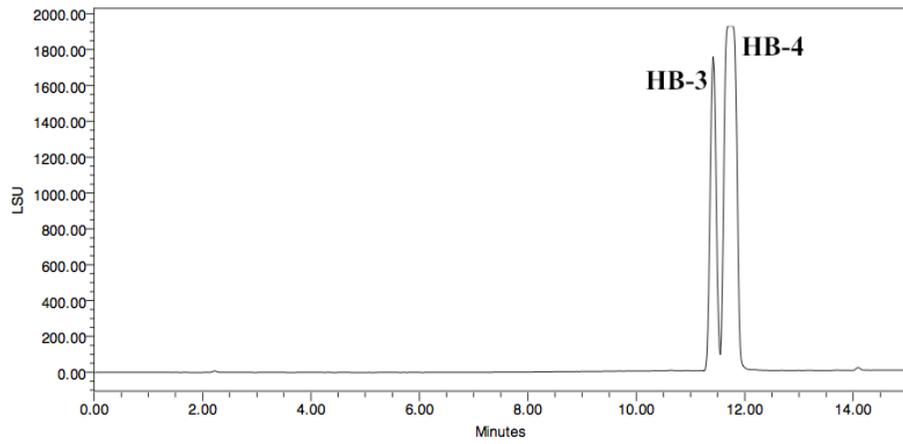


Figure 66 Chromatogramme (ELSD) de la fraction F_{2-P}

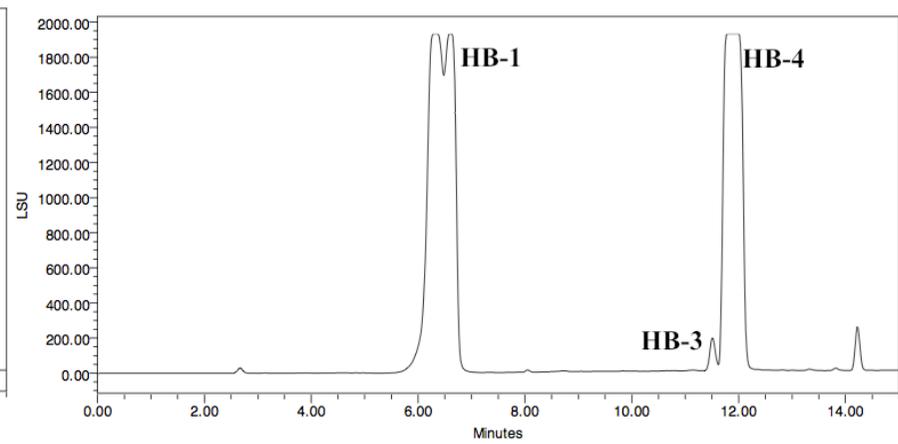
6.5.1.3 Etude de la fraction F₄

Cette fraction (2,5 g) a été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte (phase stationnaire : silice, gradient Hexane/AcOEt : 1/0 jusqu'à 0/1, puis AcOEt/EtOH : 1/0 jusqu'à EtOH pur) permettant d'obtenir douze sous-fractions (F_{4-A} à F_{4-L}), avec un rendement de colonne de 80%. Un test de l'activité antifongique sur *C. albicans* ATCC 10231 de ces douze fractions a montré que l'activité se localisait dans les fractions F_{4-G} à F_{4-J}, cette dernière fraction étant particulièrement active. Ces quatre fractions, dont les chromatogrammes sont montrés sur la figure 67 (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 10 min), ont été soumises à des purifications par HPLC semi-préparative.

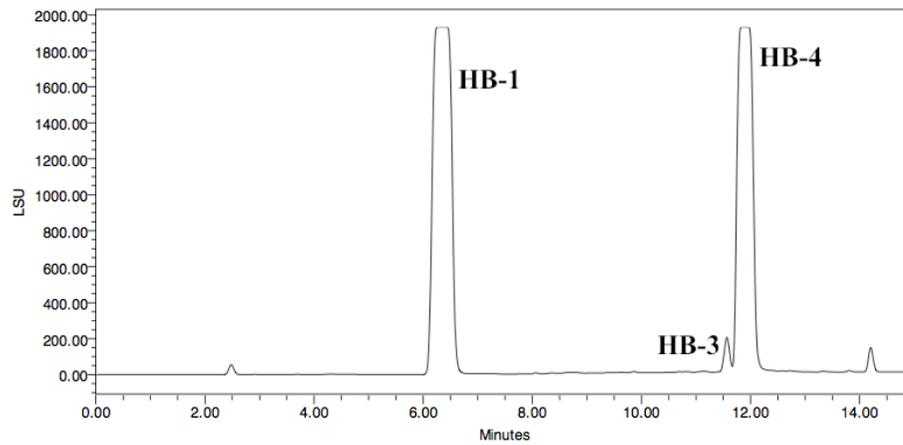
1



2



3



4

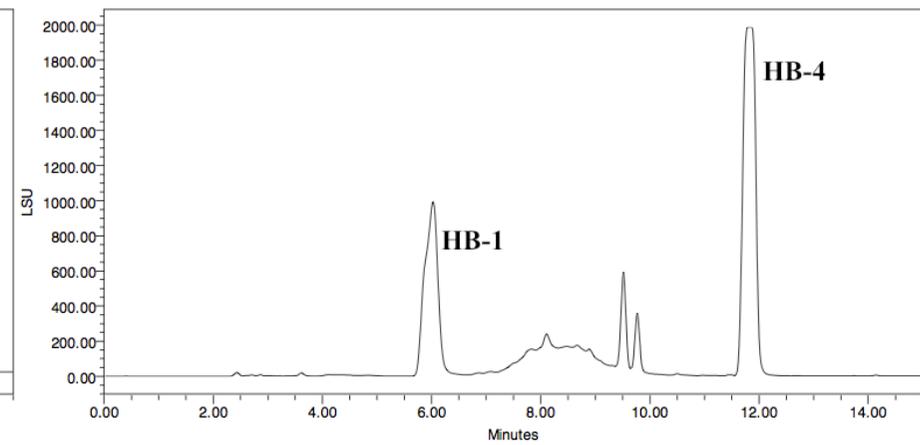


Figure 67 Chromatogrammes (ESLD) des fractions F_{4-G} (1), F_{4-H} (2), F_{4-I} (3) et F_{4-J} (4)

6.5.1.4 Purification de la fraction F_{4-G}

100 mg de la fraction F_{4-G} ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 50/50 à 0/100 en 30 min). Quatre fractions ont été obtenues puis analysées par HPLC (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 10 min), et deux se sont révélées pures et identifiées comme étant l'acide déhydroarjunolique (**HB-3**, 8 mg, 12 ppm) et l'acide arjunolique (**HB-4**, 24 mg, 36 ppm).

6.5.1.5 Purification de la fraction F_{4-H}

150 mg de la fraction F_{4-H} ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 60/40 à 0/100 en 15 min). Trois fractions ont été obtenues puis analysées par HPLC (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 10 min), et deux se sont révélées pures et identifiées comme étant l'acide arjunolique (**HB-4**, 70 mg, 105 ppm) et la bergénine (**HB-1**, 4 mg, 6 ppm).

6.5.1.6 Purification de la fraction F_{4-I}

100 mg de la fraction F_{4-I} ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 60/40 à 0/100 en 15 min). Cinq fractions ont été obtenues puis analysées par HPLC (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 10 min), et deux se sont révélées pures et identifiées comme étant l'acide arjunolique (**HB-4**, 20 mg, 30 ppm) et la bergénine (**HB-1**, 2 mg, 3 ppm).

6.5.1.7 Purification de la fraction F_{4-J}

150 mg de cette fraction ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 97/3 à 0/100 en 15 min). Onze fractions ont été obtenues puis analysées par HPLC (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 10 min), et deux se sont révélées pures et identifiées comme étant l'acide arjunolique (**HB-4**, 48 mg, 72 ppm) et la bergénine (**HB-1**, 16 mg, 24 ppm).

6.5.1.8 Conclusions sur le fractionnement de l'extrait de bois de *H. balsamifera*

Il a pu être isolé quatre molécules identifiées comme étant la bergénine (**HB-1**), l'acide maslinique (**HB-2**), l'acide déhydroarjunolique (**HB-3**) et l'acide arjunolique (**HB-3**). Les

rendements et masses sont présentés dans le tableau 28 et le processus de fractionnement est schématisé dans la figure 68.

Tableau 28 Masses et rendements des composés isolés de *H. balsamifera*

Composé	Masse (mg)	Rendement (ppm)
HB-1	22,0	33
HB-2	60,0	90
HB-3	8,0	12
HB-4	162,0	243

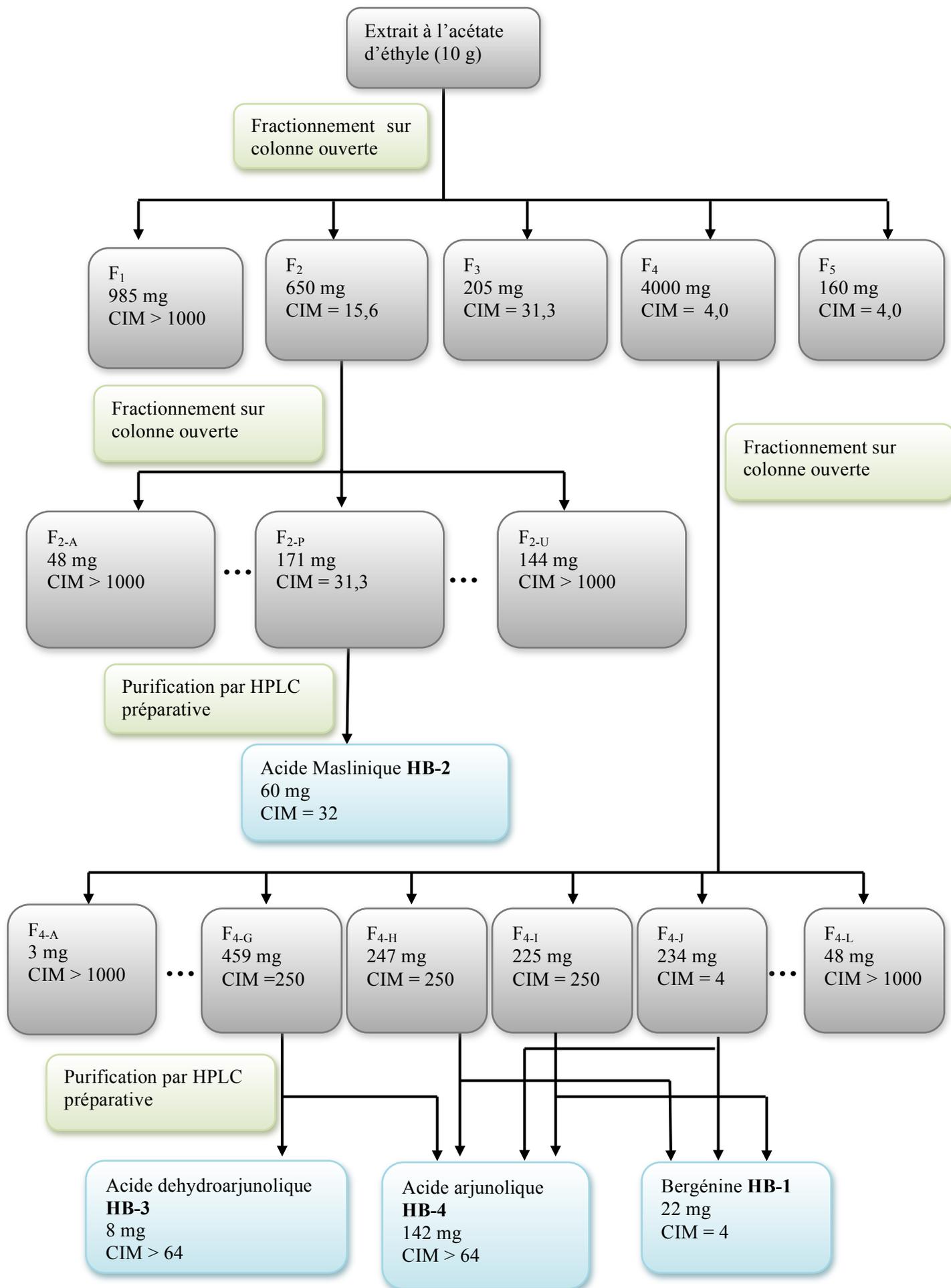


Figure 68 Schéma récapitulatif du protocole de fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *H. balsamifera*, 155 tests CIM (en µg/mL) effectués sur *C. albicans* ATCC 10231

6.5.2 Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *Peltogyne* sp.

700 mg de cet extrait ont été filtrés sur colonne de polyamide et élués par 2×5 mL de méthanol. Après évaporation, il a été obtenu 376 mg de la première élution (F_I) et 99 mg de la seconde (F_{II}), soit un rendement de 67,9% pour la filtration. La fraction F_I a présenté un CIM de 15,6 $\mu\text{g/mL}$ sur *C. albicans* ATCC 10231, alors que F_{II} a présenté un CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Les 376 mg de la fraction F_I ont été fractionnés par HPLC semi-préparative (C_{18} , gradient linéaire eau/ CH_3CN 90/10 à 0/100 en 15 min) et quinze fractions ont pu être obtenues (F_{I-1} à F_{I-15}). Ces fractions ont été testées sur *C. albicans* ATCC 10231 et seule la fraction F_{I-5} présentait la plus forte activité antifongique avec un CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$. Celle-ci a été purifiée par HPLC semi-préparative (C_{18} , gradient linéaire eau/ CH_3CN 80/20 à 0/100 en 20 min) à partir desquels il a été possible d'identifier le (+)-mopanol (**P-1**, 10 mg, 485 ppm) et le (+)-peltogynol (**P-2**, 2,0 mg, 97 ppm). Le profil chromatographique de la fraction F_I (C_{18} , gradient linéaire eau/ CH_3CN 97/3 à 0/100 en 20 min) et de la fraction F_{I-5} (C_{18} , gradient linéaire eau/ CH_3CN 80/20 à 0/100 en 15 min) est montré dans la figure 69.

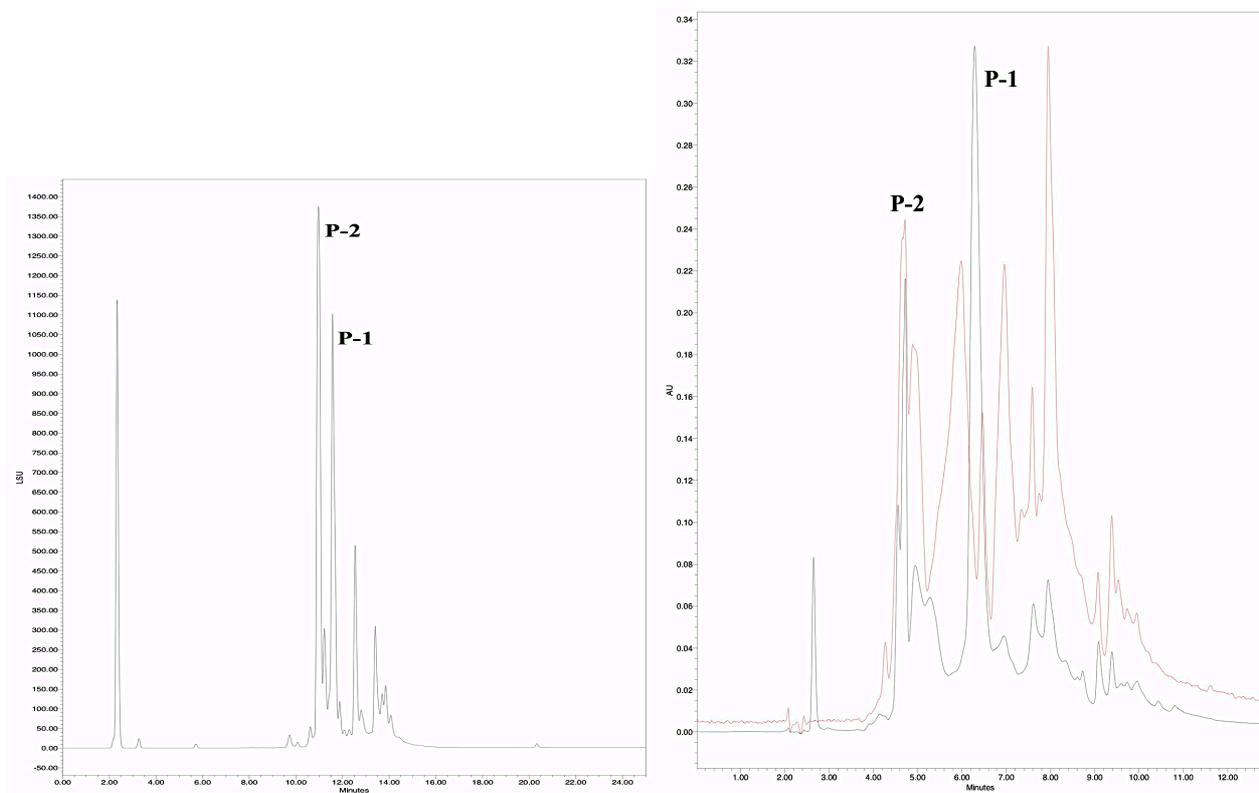


Figure 69 Chromatogrammes des fractions F_I (ELSD) et F_{I-5} (UV, à 254 nm en noir, 345 nm en rouge)

6.5.3 Extraits de *S. longifolia*

Du fait de la singularité biologique de cette espèce, les extraits de *S. longifolia* ont été soumis à un processus d'investigation phytochimique. En effet, le genre *Spirotropis* est, rappelons-le, un genre monospécifique qui n'a jamais fait l'objet d'étude phytochimique et dont la seule espèce, *S. longifolia*, adopte un comportement de monodominance sur son aire de répartition. Ainsi, le processus de fractionnement et d'isolement ne suit par rigoureusement un processus de bioguidage.

Deux extraits ont fait l'objet de travaux d'isolement, les extraits à l'acétate d'éthyle des racines et des racines adventives. Un profil chromatographique de ces deux extraits peut être observé sur la figure 70 (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 15 min).

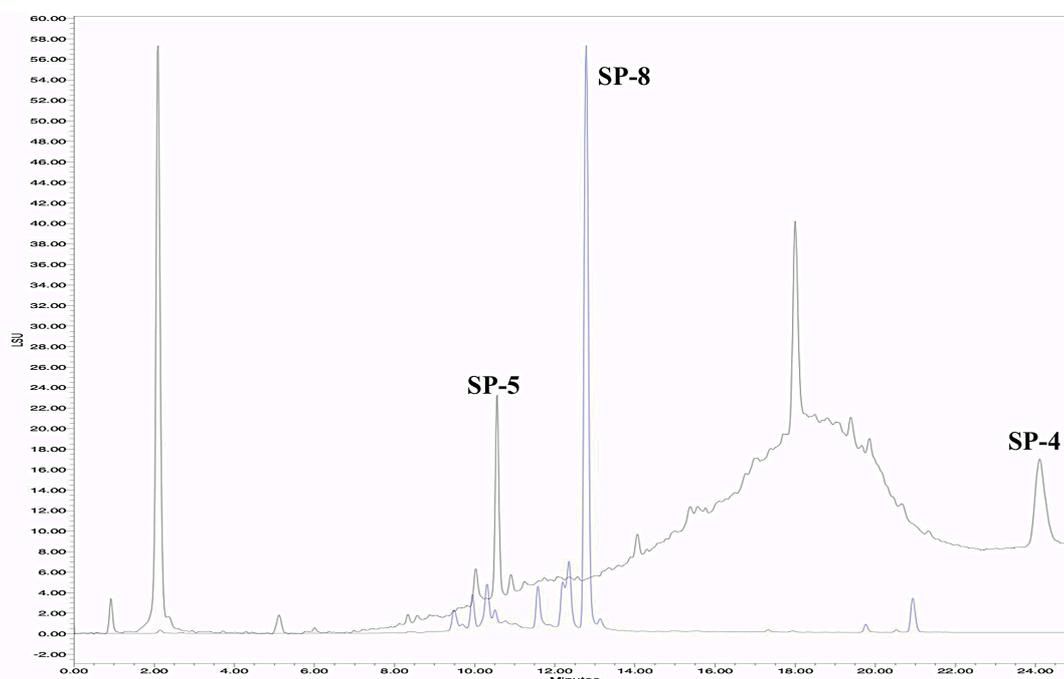


Figure 70 Profil chromatographique (ELSD) de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines (en noir) et des racines adventives (en bleu) de *S. longifolia*

6.5.3.1 Extrait à l'acétate d'éthyle des racines

Cet extrait (10 g) a été fractionné par colonne ouverte sur silice (\varnothing 8 cm) en éluant avec 2×1L d'hexane, 2×1L de dichlorométhane, 2×1L d'acétate d'éthyle, 2×1L d'éthanol et enfin 2×1L de méthanol. Dix (F₁ à F₁₀) fractions ont été collectées pour chaque solvant d'éluant. Les fractions obtenues à l'éthanol et au méthanol ont été séchées, reprises dans l'isopropanol et filtrées sur frité afin de retirer la silice dissoute. Ce fractionnement est effectué avec un rendement de 85%, les activités antifongiques sur *Candida albicans* ATCC 10231 ainsi que les masses obtenues pour

chacune des fractions sont résumées dans le tableau 29 et le processus de fractionnement est schématisé dans la figure 73.

Tableau 29 Activités et masses des fractions issues de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de *S. longifolia*

Fraction	Masse (mg)	Activité (CIM, µg/mL)
F ₁	760	>1000
F ₂	270	>1000
F ₃	130	125
F ₄	70	62.5
F ₅	3740	62.5
F ₆	2700	15.6
F ₇	370	62.5
F ₈	240	125
F ₉	120	>1000
F ₁₀	70	>1000

6.5.3.1.1 Etude de la fraction F₅

1,2 g de cette fraction ont été fractionnés par chromatographie sur colonne ouverte (phase stationnaire : silice, gradient Hexane/AcOEt) permettant d'obtenir quinze sous-fractions (F_{5-A} à F_{5-O}), avec un rendement de colonne proche de 90%. Un profil chromatographique de cette fraction est montré figure 71 (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 65/35 à 0/100 en 15 min).

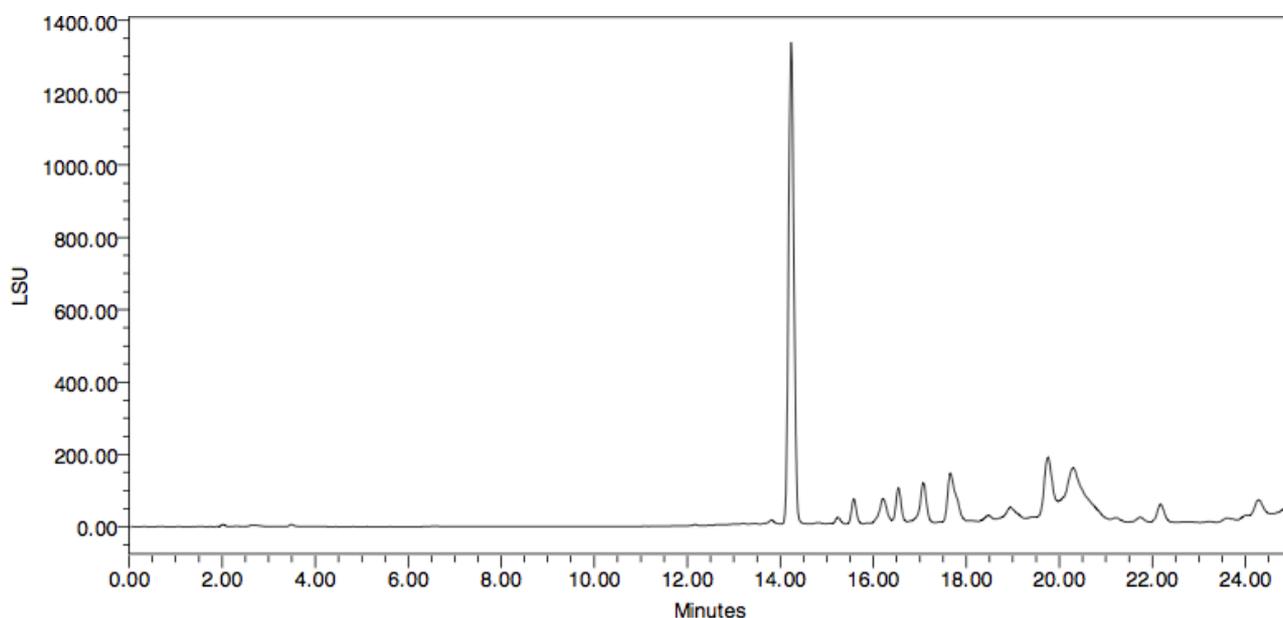


Figure 71 Profil chromatographique (ELSD) de la fraction F₅ issu de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de *S. longifolia*

Les analyses CCM (phase stationnaire : silice, éluant : Hex/AcOEt : 8/2) et RMN ont permis d'identifier la fraction F_{5-D} comme étant du lupéol (SP-4, 86 mg, 146 ppm).

6.5.3.1.2 Purification de la fraction F_{5-B}

Les 55 mg de cette fraction ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 12 min). Quatre fractions ont été obtenues à partir desquelles il a été possible d'isoler et d'identifier un nouveau composé, le 5,7,4'-trihydroxy-6,8-di(3-méthylbut-2-ényl)-2',2'-diméthylpyrano[6',5':4a',8a']-isoflavone, nommé spirotropone (SP-11, 1,0 mg, 1,7 ppm).

6.5.3.1.3 Purification de la fraction F_{5-G}

Les 53 mg de cette fraction ont été purifiés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 90/10 à 0/100 en 12 min). Quatre fractions ont été obtenues à partir desquelles il a été possible d'isoler et d'identifier un nouveau composé, le 3-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-2',2'-diméthylpyrano-[5',6':4,4]-6a-(3-méthylbut-2-ényl)-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane, nommé spirotropine A (SP-12, 2,0 mg, 2,4 ppm).

6.5.3.1.4 Purification de la fraction F₆

250 mg de cette fraction ont été soumis à une purification par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 80/20 à 0/100 en 30 min) et un profil chromatographique peut être observé figure 72 (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 70/30 à 0/100 en 13 min).

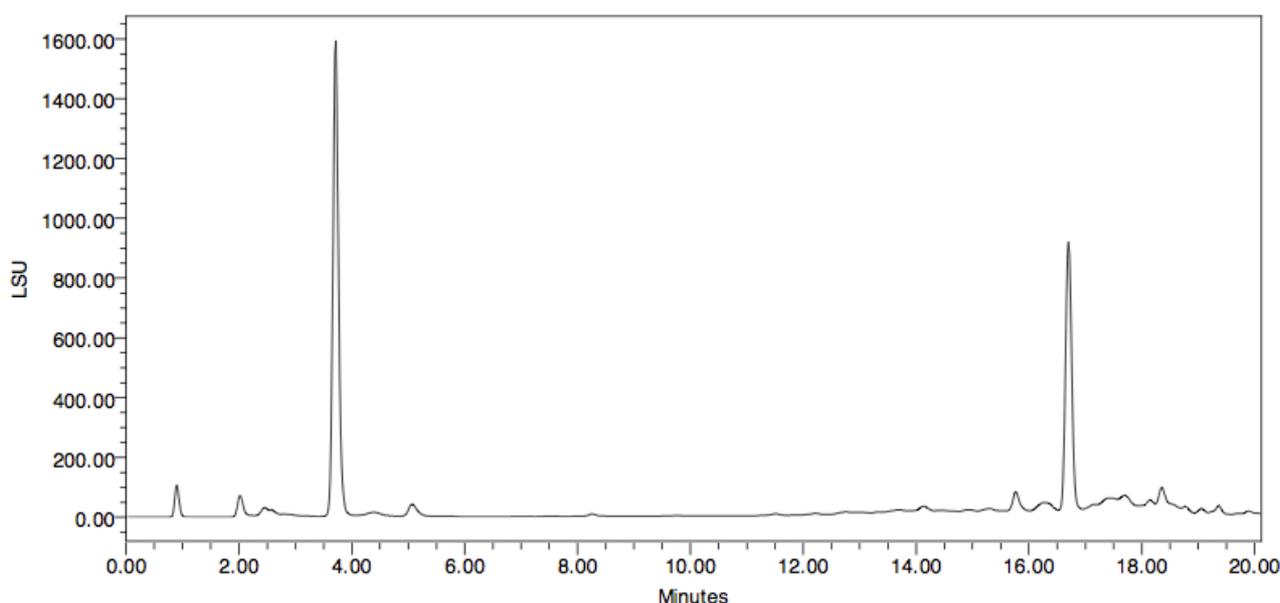


Figure 72 Profil chromatographique (ELSD) de la fraction F₆ issue de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de *S. longifolia*

Il a ainsi été obtenu cent-quinze fractions, dont les analyses HPLC et RMN ont permis de déduire l'isolement de 2 composés nouveaux, identifiés par la suite comme étant le 3-hydroxy-8,9-

méthylènedioxy-2',2'-diméthyl-3',4'-dihydropyrano-[5',6':3,4]-6a-(3-méthylbut-2-ényl)-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane, nommé spirotropine B (**SP-13**, 2,3 mg, 3,9 ppm), le 3-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-4,6a-di(3-méthylbut-2-ényl)-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane, nommé spirotropine C (**SP-14**, 4,0 mg, 6,8 ppm), ainsi que la daidzéine (**SP-1**, 1,0 mg, 1,7 ppm), la génistéine (**SP-2**, 1,0 mg, 1,7 ppm), l'isoprunétine (**SP-3**, 5,5 mg, 9,4 ppm), le picéatannol (**SP-5**, 8,0 mg, 13,6 ppm), le *trans*-resvératrol (**SP-6**, 3,0 mg, 5,1 ppm), et de nouveau la spirotropine A (**SP-12**, 1,0 mg, 1,7 ppm).

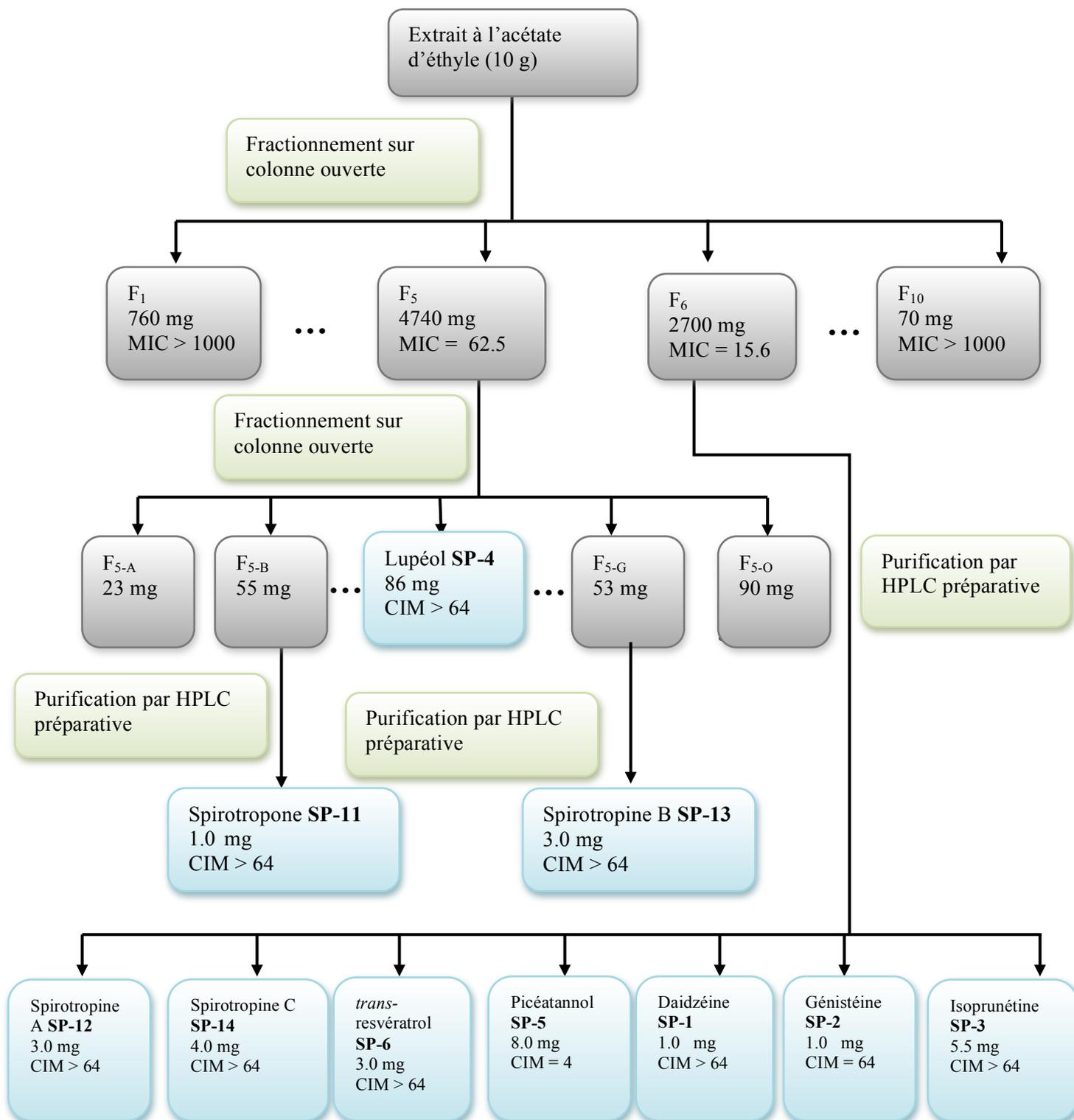


Figure 73 Schéma récapitulatif du protocole de fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle des racines de *Spirotropis longifolia*, tests CIM (en µg/mL) effectués sur *C. parapsilosis* ATCC 22019

6.5.3.2 Extrait à l'acétate d'éthyle des racines adventives

250 mg d'extrait ont ainsi été fractionnés par HPLC semi-préparative (C₁₈, gradient linéaire eau/CH₃CN 80/20 à 0/100 en 20 min) pour conduire à l'obtention de quatorze fractions (F₁ à F₁₄), à partir desquelles il a été possible d'identifier la gnétine D (SP-7, 3,4 mg, 190 ppm), la gnétine E (SP-8, 1,7 mg, 220 ppm) et le *trans*-oxyresvératrol (SP-10, 1,5 mg, 190 ppm).

6.5.3.2.1 Purification des fractions F₉ et F₁₁

Ces deux fractions ont été regroupées sur la base de leurs profils chromatographiques et purifiées par CCM préparative (phase stationnaire : silice, éluant : Hex/AcOEt : 2/8). Il a été obtenu 7 fractions, à partir desquelles il a été possible d'identifier le latifolol (SP-9, 1,5 mg, 1000 ppm).

6.5.3.3 Conclusions sur le fractionnement de ces extraits

Il a pu être isolés 14 molécules à partir des extraits à l'acétate d'éthyle des racines et des racines adventives de *S. longifolia* : la daidzéine (SP-1), la génistéine (SP-2), l'isoprunétine (SP-3), le lupéol (SP-4), le picéatannol (SP-5), le *trans*-resvératrol (SP-6), la gnétine D (SP-7), la gnétine E (SP-8), le latifolol (SP-9), le *trans*-oxyresvératrol (SP-10), la spirotropone (SP-11), la spirotropine A (SP-12), la spirotropine B (SP-13) et la spirotropine C (SP-14). Les rendements sont montrés dans le tableau 30.

Tableau 30 Masses et rendements des composés isolés de *S. longifolia*

Composé	Masse (mg)	Rendement (ppm)
SP-1	1,0	1,7
SP-2	1,0	1,7
SP-3	5,5	9,4
SP-4	86,0	146
SP-5	8,0	13,6
SP-6	3,0	5,1
SP-7	3,4	190
SP-8	1,7	220
SP-9	1,5	1000
SP-10	1,5	190
SP-11	1,0	1,7
SP-12	3,0	5,1
SP-13	3,0	5,1
SP-14	4,0	6,8

6.5.3.4 Données analytiques des composés nouveaux

Spirotropone

(5,7-dihydroxy-6,8-diprényl-2''''',2'''''-diméthylpyrano[5''''',6''''':3',4'] isoflavone) (SP-11)

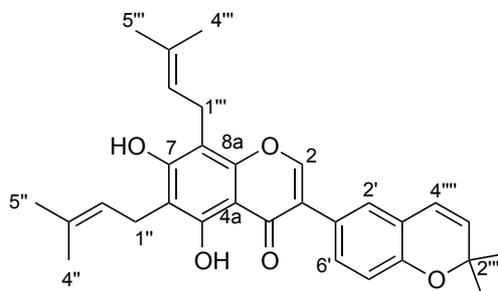


Figure 74 Structure de la spirotropone (SP-11)

Solide amorphe jaune pâle. UV (AcOEt) λ_{\max} nm (log ϵ): 269 (1.27); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 13.20 (1H, s, OH-5, échangeable OD), 7.23 (1H, dd, $J = 8.4, 2.2$, H-6'), 7.18 (1H, d, $J = 2.2$, H-2''), 6.83 (1H, d, $J = 8.4$, H-5'), 6.35 (1H, d, $J = 9.8$, H-4'''''), 6.33 (1H, s, OH-7, échangeable OD), 5.63 (1H, d, $J = 9.8$, H-3'''''), 5.27 (1H, t l, $J = 7.1$, H-2''), 5.23 (1H, t l, $J = 7.3$, H-2'''), 3.48 (1H, d, $J = 6.2$, H-1''), 3.46 (1H, d, $J = 6.2$, H-1'''), 1.84 (3H, s l, H-5'''), 1.83 (3H, s l, H-5'''), 1.77 (3H, s l, H-4''), 1.74 (3H, s l, H-4'''), 1.45 (6H, s, 2'''''- CH_3); RMN ^{13}C (100.6 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 181.0 (C-4), 159.5 (C-7), 157.4 (C-5), 153.2 (C-8a), 152.9 (C-4'), 152.2 (C-2), 134.4 (C-3'''), 130.0 (C-3'''''), 129.3 (C-6'), 126.6 (C-2'), 123.2 (C-1'), 122.9 (C-3), 122.1 (C-4'''''), 121.8 (C-3'), 121.3 (C-2'''), 121.1 (C-2''), 116.5 (C-5'), 110.0 (C-8), 109.0 (C-4a), 105.4 (C-6), 76.0 (C-2'''''), 28 (2'''''- CH_3), 25.7 (C-4'', C-4'''), 21.5 (C-1'', C-1'''), 17.7 (C-5'', C-5'''); HR-ESI-MS (positive) m/z : trouvée 473.2323 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calculée pour $[\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{O}_5]^+$: 473.2328.

Spirotropine A

(2-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-2',2'-diméthylpyrano-[5',6':4,3]-6a-prenyl-[6aS,11aS]-pterocarpane) (SP-12)

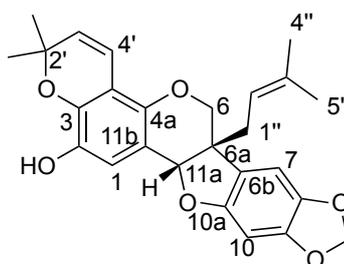


Figure 75 Structure de la spirotropine A (SP-12)

Solide amorphe jaune pâle. pf 193-194 °C; $[\alpha]_D^{25} +147.3^\circ$ (AcOEt, c 0.164); CD $[\theta]_{193.8}$ 14.38, $[\theta]_{207.0}$ -31.17, $[\theta]_{223.0}$ 28.25, $[\theta]_{241.0}$ 25.17, $[\theta]_{288.3}$ 2.92, $[\theta]_{327.0}$ -5.42 (MeCN, c 0.001); UV (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 298 (0.99), 210 (2.70); IR (cm^{-1}): 3484, 2979, 2924, 2888, 2866, 1740, 1643, 1572, 1473; RMN 1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm): 6.71 (1H, s, H-1), 6.56 (1H, s, H-7), 6.56 (1H chacun, d, $J = 10.0$, H-1'), 6.34 (1H, s, H-10), 5.87 (1H, s, $J = 1.2$, O-CH₂-O), 5.83 (1H, s, $J = 1.2$, O-CH₂-O), 5.61 (1H, d, $J = 10.0$, H-2'), 5.17 (1H, t l, $J = 7.4$, H-2''), 5.04 (1H, s, H-11a), 3.99 (1H, d, $J = 10.7$, H-6_{eq}), 3.57 (1H, d, $J = 10.7$, H-6_{ax}), 2.37 (1H, m, H-1''), 2.37 (1H, m, H-1'''), 1.66 (3H, s l, H-4''), 1.48 (3H, s l, H-5''), 1.41 (6H, s, H-4', H-5'); RMN ^{13}C (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 155.2 (C-10a), 155.2 (C-4a), 149.1 (C-8), 142.9 (C-9), 142.7 (C-3), 141.1 (C-2), 135.8 (C-3''), 130.4 (C-2'), 122.4 (C-6b), 119.7 (C-2''), 117.5 (C-1'), 117.5 (C-1), 112.5 (C-11b), 111.5 (C-4), 104.8 (C-7), 102.3 (O-CH₂-O), 94.1 (C-10), 83.5 (C-11a), 77.3 (C-3'), 71.3 (C-6), 48.2 (C-6a), 31.6 (C-1'''), 27.7 (C-4', C-5'), 25.9 (C-4''), 24.0 (C-5''); HR-ESI-MS (positive) m/z : trouvée 435.1794 $[M+H]^+$; calculée pour $[C_{26}H_{27}O_6]^+$: 435.1808.

Spirotropine B

(2-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-2',2'-diméthyl-3',4'-dihydropyrano-[5',6':4,3]-6a-prényl-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane) (SP-13)

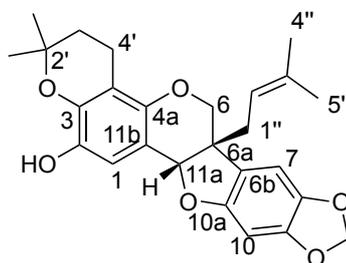


Figure 76 Structure de la spirotropine B (SP-13)

Solide amorphe jaune pâle. $[\alpha]_D^{25} +107.6^\circ$ (AcOEt, c 0.054); UV (MeCN) λ_{max} nm (log ϵ): 309 (0.05); RMN 1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm): 6.72 (1H, s, H-7), 6.70 (1H, s, H-1), 6.34 (1H, s, H-10), 5.91 (1H, s, $J = 1.1$, O-CH₂-O), 5.88 (1H, s, $J = 1.1$, O-CH₂-O), 5.20 (2H, t l, $J = 7.3$, H-2''), 5.02 (1H, s, H-11a), 3.98 (1H, d, $J = 11.0$, H-6_{eq}), 3.61 (1H, d, $J = 11.0$, H-6_{ax}), 2.69 (2H, m, H-1'), 2.45 (2H, m, H-1'''), 1.68 (3H, s l, H-4''), 1.66 (2H, m, H-2'), 1.49 (3H, s l, H-5''), 1.23 (6H, s, H-4', H-5'); RMN ^{13}C (100.6 MHz, CD_3OD , δ ppm): 155.2 (C-10a), 148.9 (C-9), 147.6 (C-4a), 145.6 (C-3), 142.2 (C-8), 140.4 (C-2), 135.6 (C-3''), 122.8 (C-6b), 119.7 (C-2''), 118.2 (C-4), 114.2 (C-11b), 111.1 (C-1), 104.7 (C-7), 102.2 (O-CH₂-O), 93.9 (C-10), 84.1 (C-11a), 71.4 (C-3'), 70.9 (C-

6), 47.8 (C-6a), 43.3 (C-2'), 31.3 (C-1''), 28.6 (C-4', C-5'), 25.7 (C-4''), 19.4 (C-1'), 17.7 (C-5''); HR-ESI-MS (positive) m/z : trouvée 437.1961 $[M+H]^+$; calculée pour $[C_{26}H_{29}O_6]^+$: 437.1964.

Spirotropine C

(2-hydroxy-8,9-méthylènedioxy-4,6a-prényl-[6a*S*,11a*S*]-ptérocarpane) (SP-14)

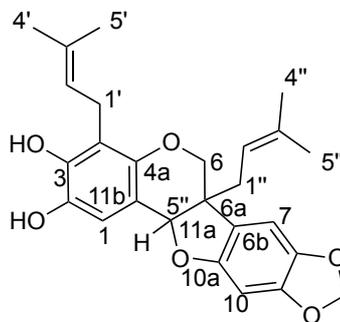


Figure 77 Structure de la spirotropine C (SP-14)

Solide amorphe jaune pâle. RMN 1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm): 6.71 (1H, s, H-7), 6.65 (1H, s, H-1), 6.33 (1H, s, H-10), 5.87 (1H, s, $J = 1.0$, O-CH₂-O), 5.84 (1H, s, $J = 1.0$, O-CH₂-O), 5.24 (1H, m, H-2'), 5.18 (1H, t, $J = 7.3$, H-2''), 5.01 (1H, s, H-11a), 3.96 (1H, d, $J = 11.0$, H-6eq), 3.57 (1H, d, $J = 11.0$, H-6ax), 3.30 (1H, m, H-1'), 2.41 (2H, m, H-1''), 1.73 (3H, s, H-5'), 1.63 (3H, s, H-4'), 1.67 (3H, s, H-4''), 1.48 (3H, s, H-5''); RMN ^{13}C (100.6 MHz, MeOD, δ ppm): 155.1 (C-10a), 148.8 (C-4a), 148.7 (C-9), 145.7 (C-3), 142.7 (C-8), 140.2 (C-2), 135.6 (C-3''), 131.0 (C-3'), 123.6 (C-2'), 122.8 (C-6b), 120.0 (C-2''), 114.2 (C-1), 113.9 (C-11b), 110.5 (C-4), 104.8 (C-7), 102.2 (O-CH₂-O), 94.0 (C-10), 84.1 (C-11a), 71.7 (C-6), 48.0 (C-6a), 31.4 (C-1''), 25.8 (C-4''), 25.7 (C-4'), 23.2 (C-1'), 17.8 (C-5''), 17.7 (C-5'); HR-ESI-MS (positive) m/z : trouvée 437.1964 $[M+H]^+$; calculée pour $[C_{26}H_{29}O_6]^+$: 437.1964.

Les corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A (SP-12), B (SP-13) et C (SP-14) sont montrées dans le tableau 31.

Tableau 31 Corrélations COSY, HMBC et NOESY des spirotropines A, B et C

Position	Spirotropine A				Spirotropine B				Position	Spirotropine C			
	¹ H (δ, ppm)	COSY	HMBC	NOESY	¹ H (δ, ppm)	COSY	HMBC	NOESY		¹ H (δ, ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	6.71 (1H, s)		C2, C3, C4a, C11b	H11a	6.70 (1H, s)		C2, C3, C4a, C11b	H11a	1	6.65 (1H, s)		C2, C3, C4a, C11b	H11a
6ax	3.57 (1H, d, <i>J</i> = 10.7)	H6 _{eq}	C1'', C4a, C6a, C11a	H6 _{eq} , H7	3.61 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	H6 _{eq}	C1'', C4a, C6a, C11a	H6 _{eq} , H7	6ax	3.57 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	H6 _{eq}	C1'', C4a, C6a, C11a	H6 _{eq} , H7
6eq	3.99 (1H, d, <i>J</i> = 10.7)	H6 _{ax}	C1'', C4a, C6a, C11a	H1'', H6 _{ax} , H7	3.98 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	H6 _{ax}	C1'', C4a, C6a, C11a	H1'', H6 _{ax} , H7	6eq	3.96 (1H, d, <i>J</i> = 11.0)	H6 _{ax}	C1'', C4a, C6a, C11a	H1'', H6 _{ax} , H7
7	6.56 (1H, s)		C8, C9, C10a	H1'', H6 _{ax} , H6 _{eq}	6.72 (1H, s)		C8, C9, C10a	H1'', H6 _{ax} , H6 _{eq}	7	6.71 (1H, s)		C8, C9, C10a	H1'', H6 _{ax} , H6 _{eq}
10	6.34 (1H, s)		C6b, C8, C9, C10a		6.34 (1H, s)		C6b, C8, C9, C10a		10	6.33 (1H, s)		C6b, C8, C9, C10a	
11a	5.04 (1H, s)		C1'', C4a, C6, C11b	H1, H1''	5.02 (1H, s)		C1'', C4a, C6, C6a, C11b	H1, H1''	11a	5.01 (1H, s)		C1'', C4a, C6, C6a, C11b	H1, H1''
2'-CH ₃	1.41 (3H, s)		C2', C3'	H3'	1.23 (3H, s)		C2', C3'	H4', H3'	4'	1.63 (3H, s)	H2'	C2', C3', C5'	H1', H2', H5'
									5'	1.73 (3H, s)	H2'	C2', C3', C4'	H1', H2', H4'

3'	5.61 (1H, d, $J = 10.0$)	H1'	C2', C4, 2'-CH ₃	H4', 2'-CH ₃	1.66 (2H, m)	H4'	C4', C2', 2'-CH ₃	H4', 2'-CH ₃	2'	5.24 (1H, m)	H1'	C1', C3', C4, C4', C5'	H4'
4'	6.56 (1H, d, $J = 10.0$)	H2'	C3', C3, C4, C4a	H3'	2.69 (2H, m)	H3'	C3', C3, C2', C4, C4a	H3', 2'-CH ₃	1'	3.30 (1H, m)	H3'	C3', C3, C4', C4, C4a	H5'
1''	2.37 (2H, m)	H2''	C2'', C3'', C6a, C6b, C11a	H11a, H6 _{eq} , H7, H5''	2.45 (2H, m)	H2''	C2'', C3'', C6a, C6b, C11a	H11a, H6 _{eq} , H7, H2'', H5''		2.41 (2H, m)	H2''	C2'', C3'', C6a, C6b, C11a	H11a, H6 _{eq} , H7, H5''
2''	5.17 (1H, t1, $J = 7.4$)	H1'', H4'', H5''	C1'', C6a, C4'', C5''	H4''	5.20 (1H, t1, $J = 7.3$)	H1'', H4'', H5''	C1'', C6a, C4'', C5''	H4''		5.18 (1H, t1, $J = 7.3$)	H1'', H4'', H5''	C1'', C6a, C4'', C5''	H4''
4''	1.66 (3H, s l)	H2'', H5''	C2'', C3'', C5''	H2'', H5''	1.68 (3H, s l)	H2'', H5''	C2'', C3'', C5''	H2'', H5''		1.67 (3H, s)	H2''	C2'', C3'', C5''	H2'', H5''
5''	1.48 (3H, s l)	H2'', H4''	C2'', C3'', C4''	H1'', H4''	1.49 (3H, s l)	H2'', H4''	C2'', C3'', C4''	H1'', H4''		1.48 (3H, s)	H2''	C2'', C3'', C4''	H1'', H4''
O-CH2-O	5.87 (1H, d, $J = 1.2$)		C8, C9		5.91 (1H, d, $J = 1.1$)		C8, C9			5.87 (1H, d, $J = 1.0$)		C8, C9	
	5.83 (1H, d, $J = 1.2$)		C8, C9		5.88 (1H, d, $J = 1.1$)		C8, C9			5.84 (1H, d, $J = 1.0$)		C8, C9	

6.5.4 Extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *U. rufescens*

Cet extrait (0,6 g) a été fractionné par colonne ouverte sur silice (\varnothing 3,2 cm) avec un gradient Hexane/AcOEt : 1/0 jusqu'à 0/1. Il a pu être obtenu 15 fractions (F₁ à F₁₅) avec un rendement proche de 90% qui ont été testées sur *T. rubrum* LMGO 4218 par le test de perforation en agar, et la meilleure activité antifongique a été observée pour la fraction F₈.

Cette fraction a alors été purifiée par CCM préparative avec un éluant hexane/AcOEt : 6/4. Il a pu être obtenu 9 fractions à partir desquelles il a pu être isolé et identifié l'ursuline (UR-1, 15,6 mg, 184 ppm).

6.6 Influence des composés actifs sur les croissances fongiques

6.6.1 Etude par microscopie de fluorescence

Les tests de microdilution ont été conduits et la lecture des résultats a été effectuée comme décrit précédemment, en accord avec la méthode M38-A2 du CLSI (CLSI, 2008a). Les protocoles de coloration et d'observation correspondent à une adaptation de méthodes décrites dans la littérature (Escalante *et al.*, 2008) et effectués comme il suit.

Le surnageant du puits à la concentration sous-inhibitrice, c'est-à-dire le dernier puits où il a pu être observé une croissance du champignon, est retiré ainsi que le surnageant du puits de contrôle de croissance. Une goutte du colorant Calcofluor White est additionnée dans ces deux puits, et le champignon adhérant au fond du puits et mis en suspension dans le colorant par agitation. Après 5 min de réaction, les suspensions de mycélium sont retirées, centrifugées à 4000 RPM durant 5 min, les surnageants de ces suspensions sont retirés et le mycélium est lavé avec 200 μ L d'eau distillée stérile.

Une goutte de la suspension de mycélium est déposée sur une lamelle de verre et les cellules sont observées au microscope. Le Calcofluor white, se liant à la chitine de la paroi fongique, est visualisé comme une fluorescence bleutée brillante et observé à travers la caméra du microscope.

6.6.2 Etude de synergie

Les tests de susceptibilités ont été conduits en accord avec les normes M38-A2 et M37-A3 du CLSI (CLSI, 2008a, b). Les dilutions en série des contrôles positifs – Itraconazole, Fluconazole – ont été effectuées dans les puits 2 à 11 des plaques de 96 puits, avec le milieu de culture, de manière à obtenir 4 fois la concentration finale et un volume de 50 μ L dans chaque puits (Figure 78). Les concentrations finales ont été déterminées par des tests préliminaires, en accord avec la susceptibilité de la souche testée.

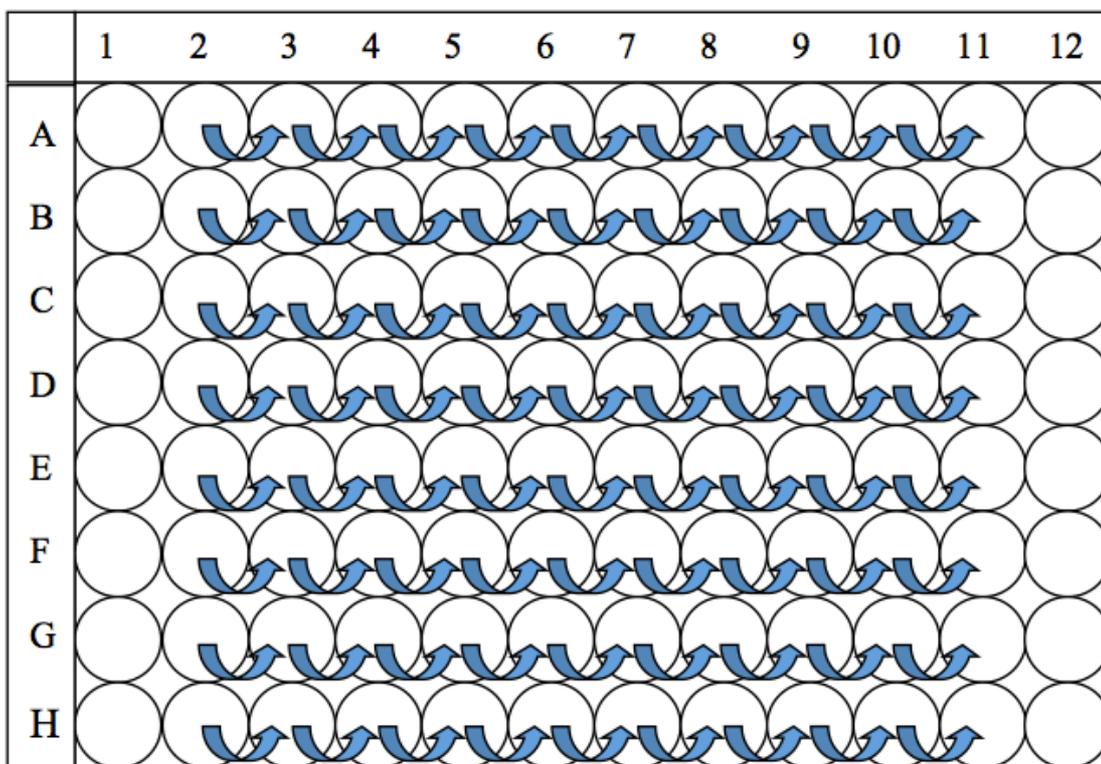


Figure 78 Dilutions en série du contrôle positif (50 μ L) dans la plaque test

Les dilutions en série des composés ont été réalisées dans une autre plaque de 96 puits, suivant le sens des puits de A à F, avec le milieu de culture, de manière à obtenir 4 fois la concentration finale et un volume de 50 μL (Figure 79). Les concentrations finales ont été déterminées par des tests préliminaires, en accord avec la susceptibilité de la souche testée.

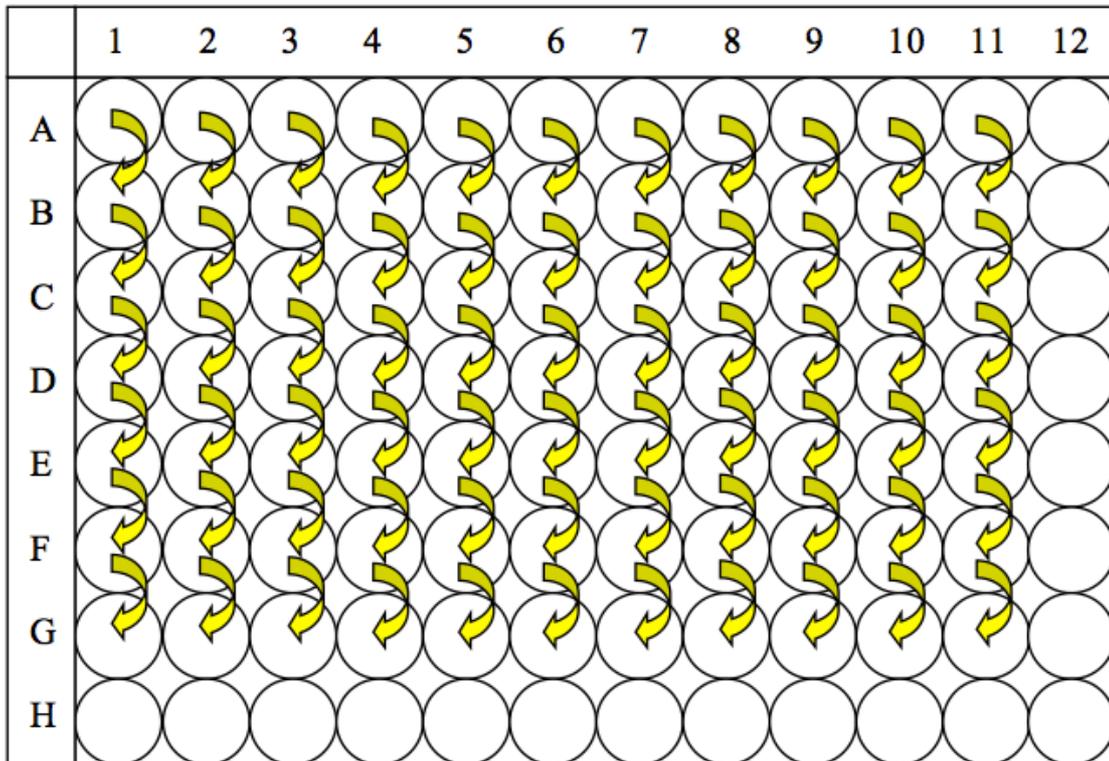


Figure 79 Dilutions en série du contrôle positif (50 μL) dans la plaque de dilution

Tout le contenu de cette plaque est ensuite transféré puits par puits dans la plaque de test (Figure 80). Après inoculation de 100 μL de la souche testée (150 μL pour les puits contenant un unique produit) dans les puits A-H \times 1-11, la plaque est incubée à 32°C. Les résultats sont observés après 5 jours pour les dermatophytes et 2 jours pour les levures. Le CIM est déterminé comme la concentration correspondant au dernier puits où la croissance fongique était visiblement nulle. Tous les tests ont été conduits en duplicata.

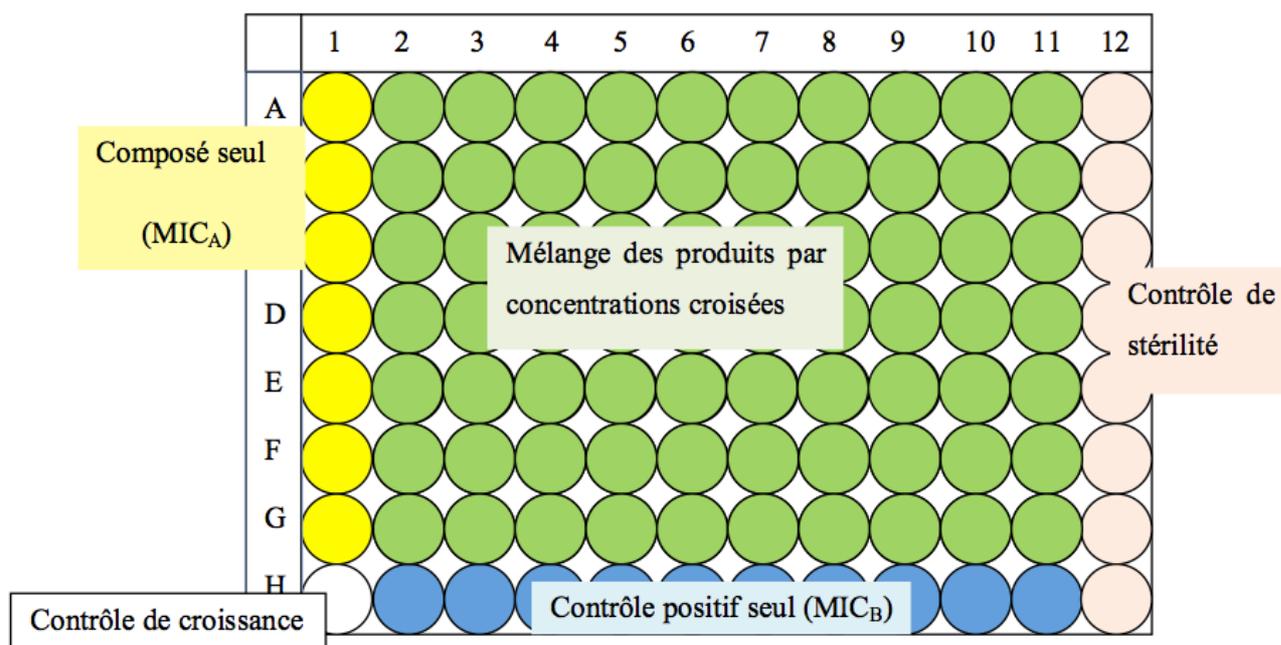


Figure 80 Plaque de test d'interaction synergique

6.6.3 Etude de l'interaction des composés avec l'ergostérol

Le protocole de l'étude de l'interaction des composés isolés avec l'ergostérol de la membrane fongique a été conduit selon une procédure adaptée de la littérature (Escalante *et al.*, 2008). Pour ce faire, de l'ergostérol exogène (99%, Sigma-Aldrich) préparé en solution mère dans du DMSO à 10 mg/mL a été ajouté en concentrations variables (250, 200, 150, 100, 50 et 0 $\mu\text{g/mL}$) sur les différentes lignes d'une plaque de 96 puits où est réalisé un test de microdilution en accord avec les normes du CLSI M27-A3 (CLSI, 2008b) sur la souche *C. albicans* ATCC 10231. L'amphotéricine B, connue pour se lier à l'ergostérol de la membrane fongique (Ellis, 2002), a été utilisée comme contrôle positif. Une augmentation de la valeur du CIM concomitante à l'augmentation de la concentration en ergostérol exogène reflète une affinité du composé pour l'ergostérol.

6.6.4 Concentration fongicide minimale

Le protocole du test de concentration fongicide minimale (CFM) a été conduit selon une procédure adaptée de la littérature (Espinel-Ingroff *et al.*, 2002 ; Prado *et al.*, 2008). Après réalisation de tests de microdilution selon les normes du CLSI (CLSI, 2008a, b), 10 µL de chaque puits montrant une complète inhibition de la croissance fongique ont été prélevés sans agitation et sous-cultivés en duplicata dans une boîte de Pétri sur un milieu agar-patate dextrose stérile. Le puits de contrôle de croissance de la plaque de 96 puits a été utilisé comme contrôle de croissance de la plaque de Pétri, et l'itraconazole, le fluconazole et l'amphotéricine B ont été utilisés comme contrôles positifs. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées ont été mises à incuber à 35°C jusqu'à observer une croissance de la sous-culture de contrôle (avant 48h généralement). La CFM a été déterminée comme étant la plus faible concentration à laquelle on n'observe pas de croissance fongique.

6.7 Activités cytotoxiques

Les essais de cytotoxicité sur les souches MRC5, KB et MDA-MB-435 ont été conduits par le Laboratoire de Cultures Cellulaires, ICSN, Gif-sur-Yvette, France. Lorsque les molécules isolées présentaient une bonne activité antifongique, leurs activités cytotoxiques ont été testées sur les cellules MRC5 et MDA-MB-435 afin de calculer leur indice de sélectivité. Sinon, elles ont été testées sur les cellules KB afin d'observer une éventuelle activité anticancéreuse.

Les cellules MRC5 sont cultivées dans un milieu de Eagle modifié par Dulbecco, complété avec 25 mM de glucose, 10% v/v de sérum de veau fœtal, 100 UI de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 1,5 µg/mL de fongizone, le tout maintenu à 37°C sous 5% de CO₂. Les plaques 96 puits tests sont ensemencées avec 2100 cellules MRC5 par puits dans 200 µL de milieu de culture.

Les cellules MDA-MB-435 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 avec de la +L-Glutamine, complété avec 10% v/v de sérum de veau fœtal, 100 UI de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 1,5 µg/mL de fongizone, le tout maintenu à 37°C sous 5% de CO₂. Les plaques 96 puits tests sont ensemencées avec 1000 cellules MDA-MB-435 par puits dans 200 µL de milieu de culture.

Les cellules KB sont cultivées dans un milieu 199 complété avec 10% v/v de sérum de veau fœtal, le tout maintenu à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules KB sont mises en culture dans des plaques Costar 12 puits avec un milieu ensemencé par une quantité de cellules entre 12×10^4 et 15×10^4 pour 2 mL (Tempete *et al.*, 1995).

Au bout de 24h, les composés dissous dans le DMSO – à 12,8 mg/mL (MDA-MB-435 et MRC5) ou 10,3M (KB) – sont additionnés dans des concentrations allant de 128,0 à 0,25 µg/ml pour les cellules MDA-MB-435 et MRC5, et à 10⁻⁵ M pour les cellules KB, et laissés pendant 72h. La concentration en DMSO par puits n'excédait pas 1%. Le nombre de cellules vivantes est mesuré à 490 nm avec du méthaneéthiosulfonate (Promega, Madison, WI) et la CI₅₀ est calculé comme étant la concentration en composé capable d'inhiber 50% de la prolifération cellulaire. L'indice de sélectivité est défini comme étant le rapport CI₅₀/CIM.

BIBLIOGRAPHIE

Afnor, 1994a. Norme NF EN 350-1: Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois. Durabilité naturelle du bois massif. Partie 1: Guide des principes d'essai et de classification de la durabilité naturelle du bois.

Afnor, 1994b. Norme NF EN 350-2 : Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois. Durabilité naturelle du bois massif. Partie 2 : Guide de la durabilité naturelle du bois et de l'imprégnabilité d'essences de bois choisies pour leur importance en Europe.

Afnor, 1996. Norme NF EN 113: Produits de préservation du bois. Méthode D'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores.

Ahmad-Junaidi, S. A., Whiting, D. A., 1990. Synthesis of (\pm)-trimethylpeltogynol via 6-*endo* radical cyclisation. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 418-419.

Aiba, C. J., Gottlieb, O. R., Maia, J. G. S., Pagliosa, F. M., Yoshida, M., 1978. Benzofuranoid neolignans from *Licaria armeniaca*. Phytochemistry 17, 2038-2039.

Aladedunye, F. A., Okorie, D. A., Ighodaro, O. M., 2008. Anti-inflammatory and antioxidant activities and constituents of *Platostoma africanum* P. Beauv. Natural Product Research 22, 1067-1073.

Alcántara, J. M., De Lima Yamaguchi, K. K., Da Veiga Jr, V. F., Lima, E. S., 2010. Essential oils composition from *Aniba* and *Licaria* species and their antioxidant and antiplatelet activities. Quimica nova 33, 141-145.

Alegrio, L. V., Fo, R. B., Gottlieb, O. R., Maia, J. G. S., 1981. Lignans and neolignans from *Licaria armeniaca*. Phytochemistry 20, 1963-1965.

Ali, Z., Tanaka, T., Iliya, I., Iinuma, M., Furusawa, M., Ito, T., Nakaya, K. I., Murata, J., Darnaedi, D., 2003. Phenolic constituents of *Gnetum klossii*. Journal of Natural Products 66, 558-560.

Aly, R., 1994. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31, S21-S25.

Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, N., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., Dabur, R., 2009. Natural products - Antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research* 11, 621-638.

Arreola-Cortés, A., Soriano-Bello, E. L., Lozoya-Gloria, E., Barriga-Guzman, A., Garcia-Pineda, E., 2007. The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 40, 69-73.

Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M. C., Obrador, E., Estrela, J. M., 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 387-398.

Baddley, J. W., Pappas, P. G., 2005. Antifungal combination therapy: Clinical potential. *Drugs* 65, 1461-1480.

Baginski, M., Czub, J., 2009. Amphotericin B and its new derivatives - Mode of action. *Current Drug Metabolism* 10, 459-469.

Bala, A. E. A., Kollmann, A., Ducrot, P. H., Majira, A., Kerhoas, L., Leroux, P., Delorme, R., Einhorn, J., 2000. *Cis* viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. *Journal of Phytopathology* 148, 29-32.

Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., Nishino, H., 2005. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1995-1999.

Baran, R., Gupta, A. K., Picard, G. E., 2005. Pharmacotherapy of onychomycosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 6, 609-624.

Barchiesi, F., Schimizzi, A. M., Najvar, L. K., Bocanegra, R., Caselli, F., Di Cesare, S., Giannini, D., Falconi Di Francesco, L., Giacometti, A., Carle, F., Scalise, G., Graybill, J. R., 2001. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1355-1359.

Barron, D., Ibrahim, R. K., 1996. Isoprenylated flavonoids - A survey. *Phytochemistry* 43, 921-982.

Bartnicki-Garcia, S., 2002. Hyphal tip growth: Outstanding questions. *Molecular Biology of Fungal Development*, 29-58.

Bednarek, P., Osbourn, A., 2009. Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746-748.

Berthou, S., Lebœuf, M., Cavé, A., Guinaudeau, H., 1989. Alcaloides des annonacées, 89: Bisbenzylisoquinoléines de *Guatteria guianensis*. *Journal of Natural Products* 52, 95-98.

Biacs, P. A., Gruiz, K., 1982. Effect of saponins and sterols on the membrane composition of *Trichoderma viride*. *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*.

Bisoli, E., Garcez, W. S., Hamerski, L., Tieppo, C., Garcez, F. R., 2008. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. *Molecules* 13, 2717-2728.

Blankenship, J. R., Mitchell, A. P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 9, 588-594.

Boralle, N., Gottlieb, H. E., Gottlieb, O. R., Kubitzki, K., Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Young, M. C. M., 1993. Oligostilbenoids from *Gnetum venosum*. *Phytochemistry* 34, 1403-1407.

Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., De Lima, R. A., Torge, R., Delle Monache, G., 2009. Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry* 16, 3414-3468.

Brinker, A. M., Seigler, D. S., 1991. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Phytochemistry* 30, 3229-3232.

Calda, C. S., De Simone, C. A., Periera, M. A., Malta, V. R. S., Carvalho, R. L. P., 2002. Bergenin monohydrate, a constituent of *Humiria balsamifera*. *Acta Crystallographica Section E* 58, 609-611.

Cantón, E., Pemón, J., Viudes, A., Quindós, G., Gobernado, M., Espinel-Ingroff, A., 2003. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 45, 203-206.

Carneiro, J. S., Emmert, L., Sternadt, G. H., Mendes, J. C., Almeida, G. F., 2009. Decay susceptibility of Amazon wood species from Brazil against white rot and brown rot decay fungi. *Holzforschung* 63, 767-772.

Chabasse, D., Guiguen, C., Contet-Audonneau, N., 1999. *Abrégés de mycologie médicale*. Éditions Masson, Paris, Fr.

Chan, W. R., Forsyth, W. G. C., Hassall, C. H., 1958. The constitution of the leucoanthocyanidin, peltogynol. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3174-3179.

Chew, Y. L., Ling Chan, E. W., Tan, P. L., Lim, Y. Y., Stanslas, J., Goh, J. K., 2011. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11.

Chichignoud, M., Don, G., Detienne, P., Parant, B., Vantomme, P., 1990. *Atlas des Bois Tropicaux d'Amérique Latine*. 218.

Chou, T. C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* 58, 621-681.

Chudnoff, M., 1984. *Tropical Timbers of the World*. Agricultural Handbook, 466.

Clark, A. M., Hufford, C. D., 1992. Chapter 2 Antifungal alkaloids. *Antifungal Alkaloids* 42, 117-150.

CLSI, 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd edn. Document M38-A2.

CLSI, 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 2nd edn. Document M27-A3.

Cortes, D., Hocquemiller, R., Leboeuf, M., Cavé, A., Moretti, C., 1986. Alcaloïdes des annonacées, 68: Alcaloïdes des feuilles de *Guatteria ouregou*. *Journal of Natural Products* 49, 878-884.

Cortes, D., Ramahatra, A., Cavé, A., De Carvalho Bayma, J., Dadoun, H., 1985. Alcaloïdes des annonacees, LVIII. Alcaloïdes des écorces de *Guatteria schomburgkiana*. Journal of Natural Products 48, 254-259.

Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., Wyllie, S. G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 88, 170-175.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Norman, G. L., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants 24, 68.

Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 26, 343-356.

Da Silva, J. M. C., Rylands, A. B., Da Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. Conservation Biology 19, 689-694.

Da Silva, S. L., de Oliveira, V. G., Yano, T., Nunomura, R. C. S., 2009. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Acta Amazonica 39, 187-192.

Da Silva, T. B. C., Alves, V. L., Mendonça, L. V. H., Conserva, L. M., Da Rocha, E. M. M., Andrade, E. H. A., Lemos, R. P. L., 2004. Chemical constituents and preliminary antimalarial activity of *Humiria balsamifera*. Pharmaceutical Biology 42, 94-97.

De Abreu, H. A., Aparecida Dos S. Lago, I., Souza, G. P., Pila-Veloso, D., Duarte, H. A., Alcantara, A. F. D. C., 2008. Antioxidant activity of (+)-bergenin - a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). Organic and Biomolecular Chemistry 6, 2713-2718.

De Almeida, M. E., Gottlieb, O. R., Rago de sousa, J., Teixeira, M. A., 1974. New peltogynoids from three *Peltogyne* species. Phytochemistry 13, 1225-1228.

De Jesus, M. A., De Morais, J. W., De Abreu, R. L. S., Cardias, M. D. F. C., 1998. Natural durability of 46 amazonian woods species in a ground essay in a forest environment. Scientia Florestalis, 81-92.

De Siqueira, J. M., Bomm, M. D., Pereira, N. F. G., Garcez, W. S., Boaventura, M. A. D., 1998. Activity - Guided isolation of constituents of *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, based on the Brine Shrimp Lethality bioassay. *Quimica nova* 21, 557-559.

Dean, B. M., Walker, J., 1958. A new source of bergenin. *Chemical Industries*, 1696-1697.

Develoux, M., 2001. Griseofulvin. *Griseofulvine* 128, 1317-1325.

Dewick, P. M., 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

Dixon, R. A., Ferreira, D., 2002. Genistein. *Phytochemistry* 60, 205-211.

Domínguez, J. M., Martín, J. J., 1998. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 2279-2283.

Douglas, C. M., 2001. Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Medical Mycology*, Supplement 39, 55-66.

Drake, L. A., Dinehart, S. M., Farmer, E. R., Goltz, R. W., Graham, G. F., Hordinsky, M. K., Lewis, C. W., Pariser, D. M., Skouge, J. W., Webster, S. B., Whitaker, D. C., Butler, B., Lowery, B. J., Elewski, B. E., Elgart, M. L., Jacobs, P. H., Leshner Jr, J. L., Scher, R. K., 1996. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: Piedra. *Journal of the American Academy of Dermatology* 34, 122-124.

Drewes, S. E., Roux, D. G., 1965. Absolute configuration of mopanol, a new leucoanthocyanidin from *Colophospermum mopane*. *Chemical Communication (London)*, 500-502.

Du, H., Huang, Y., Tang, Y., 2010. Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1293-1312.

ECOFOG, 2008. Database of species from french Guyana. Mariwenn. CIRAD, in <http://ecofog.cirad.fr/Mariwenn/>.

Eisenhauer, E. A., Vermorcken, J. B., 1998. The taxoids. *Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential*. *Drugs* 55, 5-30.

El Lahlou, H., Hirai, N., Tsuda, M., Ohigashi, H., 1999. Triterpene phytoalexins from nectarine fruits. *Phytochemistry* 52, 623-629.

Ellis, D., 2002. Amphotericin B: Spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 7-10.

Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., Zacchino, S., 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products* 71, 1720-1725.

Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G., Walsh, T. J., 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3204-3208.

Facundo, V. A., Riosa, K. A., Medeiros, C. M., Militão, J. S. L. T., Miranda, A. L. P., Epifanio, R. D. A., Carvalho, M. P., Andrade, A. T., Pinto, A. C., Rezende, C. M., 2005. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: Anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16, 1309-1312+S1301.

Ferreira, D., Marais, J. P. J., Slade, D., 2003. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*. *Phytochemistry* 64, 31-51.

Ferrigni, N. R., McLaughlin, J. L., Powell, R. G., Smith Jr, C. R., 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *Journal of Natural Products* 47, 347-352.

Fonty, E., Molino, J.-F., Prévost, M. F., Sabatier, D., in press. A new case of neotropical monodominant forest: *Spirotropis longifolia* (Leguminosae - Papilionoideae) in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology*.

Fotie, J., Bohle, D. S., Leimanis, M. L., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack, A. E., 2006. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. *Journal of Natural Products* 69, 62-67.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition* 88, 587-605.

Gao, S., Feng, N., Yu, S., Yu, D., Wang, X., 2004. Vasodilator constituents from the roots of *Lysidice rhodostega*. *Planta Medica* 70, 1128-1134.

Geahlen, R. L., McLaughlin, J. L., 1989. Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165, 241-245.

Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J., 1996. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 279-291.

Gerard, J., Guibal, D., Beauchêne, J., Fouquet, D., Langbour, P., Thévenon, M. F., Thibaut, A., Vernay, M., 2009. Technological Characteristics of 245 Species. Tropix 6.0. CIRAD, in <http://tropix.cirad.fr/>.

Ghannoum, M. A., Rice, L. B., 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 501-517.

Granato, D., Nunes, D. S., De Mattos, P. P., De Moura Rios, E., Glinski, A., Rodrigues, L. C., Zanusso Jr, G., 2005. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 237-241.

Grayer, R. J., Kokubun, T., 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56, 253-263.

Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H., Prévost, M. F., 2004. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles, Palikur, Wayãpi*. IRD Editions, Montpellier.

Gruiz, K., Biacs, P. A., 1989. Membrane lipid composition of *Trichoderma* strains and their sensitivity to saponin and polyene antibiotics. *Biological Role of Plant Lipids*.

Gullo, V. P., McAlpine, J., Lam, K. S., Baker, D., Petersen, F., 2006. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 523-531.

Gunji, S., Arima, K., Beppu, T., 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry* 47, 2061-2069.

Gupta, A. K., Cooper, E. A., 2008. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166, 353-367.

Ha, D. T., Kim, H., Thuong, P. T., Ngoc, T. M., Lee, I., Hung, N. D., Bae, K., 2009. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 304-309.

Halabalaki, M., Alexi, X., Aligiannis, N., Lambrinidis, G., Pratsinis, H., Florentin, I., Mitakou, S., Mikros, E., Skaltsounis, A. L., Alexis, M. N., 2006. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. *Planta Medica* 72, 488-493.

Harborne, J. B., 1997. Flavonoid patterns in the genus *Inga*. Pennington, T.D. (Ed.), *The Royal Botanic Gardens, Kew*.

Hauser, D., Sigg, H. P., 1971. Isolation and decomposition of sordarin. *Helvetica Chimica Acta* 54, 1178-1190.

Hawksworth, D. L., 2006. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95, 14.

Hay, R., 2009. Superficial fungal infections. *Medicine* 37, 610-612.

Hay, R. J., 2006. Fungal infections. *Clinics in Dermatology* 24, 201-212.

Herth, W., Schnepf, E., 1980. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* 105, 129-133.

Highley, T. L., Scheffer, T. C., 1970. Natural decay resistance of 30 peruvian woods. USDA Forest Service. Research Paper FPL 143, Forest Products Laboratory, Madison WI.

Hufford, C. D., Liu, S., Clark, A. M., Oguntimein, B. O., 1987. Anticandidal activity of eupolauridine and onychine, alkaloids from *Cleistopholis patens*. *Journal of Natural Products* 50, 961-964.

Iliya, I., Tanaka, T., Furasawa, M., Ali, Z., Nakaya, K. I., Iinuma, M., Shirataki, Y., Murata, J., Darnaedi, D., 2001. Four new glucosides of stilbene oligomers from the stem of *Gnetum gnemonoides*. *Heterocycles* 55, 2123-2130.

Iliya, I., Tanaka, T., Iinuma, M., Ali, Z., Furasawa, M., Nakaya, K. I., Shirataki, Y., Murata, J., Darnaedi, D., 2002a. Stilbene derivatives from two species of Gnetaceae. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 796-801.

Iliya, I., Tanaka, T., Iinuma, M., Furasawa, M., Ali, Z., Nakaya, K. I., Murata, J., Darnaedi, D., 2002b. Five stilbene glucosides from *Gnetum gnemonoides* and *Gnetum africanum*. *Helvetica Chimica Acta* 85, 2394-2402.

Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., Shimada, J., 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 237, 325-331.

Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donneze, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clément, C., Courot, E., 2010. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors* 36, 331-341.

Jiménez-Gonzalez, L., Alvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., Rodríguez-García, I., 2008. Pterocarpan: Interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews* 7, 125-154.

Kanchanapoom, T., Suga, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Kamel, M. S., Mohamed, M. H., 2002. Stilbene and 2-arylbenzofuran glucosides from the rhizomes of *Schoenocaulon officinale*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 863-865.

Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simporé, J., Colizzi, V., Traore, A. S., 2006. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology* 5, 195-200.

Koyama, J., Morita, I., Kobayashi, N., Osakai, T., Usuki, Y., Taniguchi, M., 2005. Structure-activity relations of azafluorenone and azaanthraquinone as antimicrobial compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15, 1079-1082.

Kozerski, L., Kamienski, B., Kawecki, R., Urbanczyk-Lipkowska, Z., Bocian, W., Bednarek, E., Sitkowski, J., Zakrzewska, K., Nielsen, K. T., Hansen, P. E., 2003. Solution and solid state ^{13}C NMR and X-ray studies of genistein complexes with amines. Potential biological function of the C-7, C-5, and C-4'-OH groups. *Organic and Biomolecular Chemistry* 1, 3578-3585.

Kulesh, N. I., Vasilevskaya, N. A., Veselova, M. V., Denisenko, V. A., Fedoreev, S. A., 2008. Minor polyphenols from *Maackia amurensis* wood. *Chemistry and Natural Compounds* 44, 712-714.

Kuno, N., Shinohara, G., 2003. External Agent for the skin and Whitening Agent. In: The Nisshin OilliO, I. (Ed.), United States Patent Application Publication, vol. 20030133958. The Nisshin OilliO, ldt., USA.

Lapčik, O., 2007. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* 68, 2909-2916.

Laprévote, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., 1987. Alcaloïdes des annonacées, 84. Bisaporphinoïdes de l'*Unonopsis spectabilis*. *Journal of Natural Products* 50, 984-988.

Laprévote, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., 1988. Alcaloïdes des annonacées, 87. Azafluorènones de l'*Unonopsis spectabilis*. *Journal of Natural Products* 51, 555-561.

Laszczyk, M. N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica* 75, 1549-1560.

Lavault, M., Guinaudeau, H., Bruneton, J., Sevenet, T., Hadi, H. A., 1990. (-)-Thaipetaline, a tetrahydroprotoberberine from a *Malayan annonaceae*. *Phytochemistry* 29, 3845-3847.

Levinson, W., 2006a. Cutaneous & subcutaneous mycoses. *Review of medical microbiology and immunology*, 659.

Levinson, W., 2006b. Sistemic mycoses. *Review of medical microbiology and immunology*, 659.

Lewis, R. E., 2007. Pharmacodynamic implications for use of antifungal agents. *Current Opinion in Pharmacology* 7, 491-497.

Li, C., Yang, Z., Zhai, C., Qiu, W., Li, D., Yi, Z., Wang, L., Tang, J., Qian, M., Luo, J., Liu, M., 2010. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-KB signaling pathway. *Molecular Cancer*, 73.

Li, J. W. H., Vederas, J. C., 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161-165.

Li, S. R., Chen, P. Y., Chen, L. Y., Lo, Y. F., Tsai, I. L., Wang, E. C., 2009. Synthesis of hagin E, equol, daidzein, and formononetin from resorcinol via an isoflavene intermediate. *Tetrahedron Letters* 50, 2121-2123.

Lins, A. P., Ribeiro, M. N. d. S., Gottlieb, O. R., Gottlieb, H. E., 1982a. Chemistry of Brazilian Gnetaceae. I. Gnetins: resveratrol oligomers from *Gnetum* species. *Journal of Natural Products* 45, 754-761.

Lins, A. P., Ribeiro, M. N. D. S., Gottlieb, O. R., Gottlieb, H. E., 1982b. Gnetins: Resveratrol oligomers from *Gnetum species*. *Journal of Natural Products* 45, 754-761.

Liu, A. L., Yang, F., Zhu, M., Zhou, D., Lin, M., Lee, S. M. Y., Wang, Y. T., Du, G. H., 2010. In vitro anti-influenza viral activities of stilbenoids from the lianas of *Gnetum pendulum*. *Planta Medica* 76, 1874-1876.

Lokvam, J., Kursar, T. A., 2005. Divergence in structure and activity of phenolic defenses in young leaves of two co-occurring *Inga* species. *Journal of Chemical Ecology* 31, 2563-2580.

Lozovaya, V. V., Lygin, A. V., Zernova, O. V., Ulanov, A. V., Li, S., Hartman, G. L., Widholm, J. M., 2007. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. *Planta* 225, 665-679.

Lupi, O., Tying, S. K., McGinnis, M. R., 2005. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 931-954.

Ma, J., Luo, X. D., Protiva, P., Yang, H., Ma, C., Basile, M. J., Weinstein, I. B., Kennelly, E. J., 2003. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products* 66, 983-986.

Mahato, S. B., Kundu, A. P., 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517-1575.

Majoros, L., Kardos, G., 2008. Fungicidal activity of azole antifungal agents. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 7, 118-125.

Malan, E., Roux, D. G., 1974. (+)-2,3-*trans*-pubeschin, the first catechin analogue of peltogynoids from *Peltogyne pubescens* and *P. venosa*. *Phytochemistry* 13, 1575-1579.

Mannila, E., Talvitie, A., Kolehmainen, E., 1993. Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry* 33, 813-816.

Mathew, B. P., Nath, M., 2009. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem* 4, 310-323.

McGeady, P., Wansley, D. L., Logan, D. A., 2002. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. *Journal of Natural Products* 65, 953-955.

Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E., Walsh, T. J., 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro* - *in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 602-609.

Melo e Silva, F., De Paula, J. E., Espindola, L. S., 2009. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* 52, 511-517.

Mimaki, Y., Harada, H., Sakuma, C., Haraguchi, M., Yui, S., Kudo, T., Yamazaki, M., Sashida, Y., 2003. Enterolosaponins A and B, novel triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their macrophage-oriented cytotoxic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13, 623-627.

Miyase, T., Sano, M., Yoshino, K., Nonaka, K., 1999. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (ii). *Phytochemistry* 52, 311-319.

Molyneux, R. J., Panter, K. E., 2009. Chapter 3 Alkaloids Toxic to Livestock. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 67, 143-216.

Monteiro, V. D. F. F., Mathias, L., Vieira, I. J. C., Schripsema, J., Braz-Filho, R., 2002. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13, 281-287.

Moretti, C., Gaillard, Y., Grenand, P., Bévalot, F., Prévosto, J. M., 2006. Identification of 5-hydroxy-tryptamine (bufotenine) in takini (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 198-202.

Nakayama, T., Kajiya, K., Kumazawa, S., 2006. Chapter 4: Interaction of plant polyphenols with liposomes. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 4, 107-133.

Nemli, G., Gezer, E. D., Yildiz, S., Temiz, A., Aydin, A., 2006. Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from particles impregnated with *Pinus brutia* bark extractives. *Bioresource Technology* 97, 2059-2064.

Nguyen, M. H., Barchiesi, F., Yu, V. L., Rinaldi, M. G., 1995. *In vitro* evaluation of combination of fluconazole and flucytosin against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1691.

Nitta, T., Arai, T., Takamatsu, H., Inatomi, Y., Murata, H., Inuma, M., Tanaka, T., Ito, T., Asai, F., Ibrahim, I., Nakanishi, T., Watabe, K., 2002. Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Health Science* 48, 273-276.

Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., 2003. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11, 272-279.

ONF, 2004. Guide de Reconnaissance des Arbres de Guyane 2nd ed. Office National des Forêts.

Parra, A., Rivas, F., Lopez, P. E., Garcia-Granados, A., Martinez, A., Albericio, F., Marquez, N., Munoz, E., 2009. Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 1139-1145.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 133-163.

Pfaller, M. A., Sutton, D. A., 2006. Review of in vitro activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56, 147–152.

Piacente, S., Pizza, C., De Tommasi, N., Mahmood, N., 1996. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity. *Journal of Natural Products* 59, 565-569.

Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

Pinto, E., Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Gonçalves, M. J., 2007. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products* 26, 135-141.

Powers, J. H., 2004. Considerations in clinical trials of combination antifungal therapy. *Clinical Infectious Diseases* 39, S228-S235.

Prado, M. R., Brito, E. H. S., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Leite, J. J. G., Sidrim, J. J. C., Rocha, M. F. G., 2008. Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Microbiological Methods* 75, 341-343.

Qin, X., Yang, Y., Fan, T. T., Gong, T., Zhang, X. N., Huang, Y., 2010. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergenin-phospholipid complex. *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 127-136.

Rae, J. M., Creighton, C. J., Meck, J. M., Haddad, B. R., Johnson, M. D., 2007. MDA-MB-435 cells are derived from M14 Melanoma cells - A loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Research and Treatment* 104, 13-19.

Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E., Hostettmann, K., 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations: Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica* 60, 41-44.

Ramachandra Row, L., Subba Rao, G. S. R., 1962. Chemistry of *Terminalia* species-VI. The constitution of tomentosic acid, a new triterpene carboxylic acid from *Terminalia tomentosa* wight et arn. *Tetrahedron* 18, 827-838.

Ramaiah, P. A., Row, L. R., Reddy, D. S., Anjaneyulu, A. S. R., Ward, R. S., Pelter, A., 1979. Isolation and characterisation of bergenin derivatives from *Macaranga peltata*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2313-2316.

Redman, R. S., Dunigan, D. D., Rodriguez, R. J., 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: Who controls the outcome, host or invader? New Phytologist 151, 705-716.

Reinwald, S., Weaver, C. M., 2006. Soy isoflavones and bone health: A double-edged sword? Journal of Natural Products 69, 450-459.

Reyes, F. J., Centelles, J. J., Lupianez, J. A., Cascante, M., 2006. (2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. FEBS Letters 580, 6302-6310.

Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., Lupianez, J. A., Cascante, M., 2009. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. Cancer Letters 273, 44-54.

Rodrigues, A. M. S., 2010. Análise e valorização bioinspirada dos metabólitos secundários responsáveis pela durabilidade natural das madeiras exploradas na Guiana Francesa. Faculdade da saude. Universidade de brasilia, Brasilia, p. 265.

Rodrigues, A. M. S., Theodoro, P. N. E. T., Eparvier, V., Basset, C., Silva, M. R. R., Beauchêne, J., Espíndola, L. S., Stien, D., 2010. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. Journal of Natural Products 73, 1706-1707.

Ruhnke, M., 2006. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. Current Drug Targets 7, 495-504.

Russell, G. B., Sirat, H. M., Sutherland, O. R. W., 1990. Isoflavones from root bark of gorse. Phytochemistry 29, 1287-1291.

Schaible, U. E., Kaufmann, S. H. E., 2005. A nutritive view on the host-pathogen interplay. Trends in Microbiology 13, 373-380.

Scheffer, T. C., Morrell, J. J., 1998. Natural durability of wood: A worldwide checklist of species. Forest Research Laboratory Research Contribution 22, 58.

Schultz, T. P., Nicholas, D. D., 2000. Naturally durable heartwood: Evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54, 47-52.

Selitreffnikoff, C. P., 2001. Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2883-2894.

Shai, L. J., McGaw, L. J., Aderogba, M. A., Mdee, L. K., Eloff, J. N., 2008. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 238-244.

Shao, P. L., Huang, L. M., Hsueh, P. R., 2006. Invasive fungal infection – laboratory diagnosis and antifungal treatment. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 39, 10.

Silva, J. R. A., do Carmo, D. F., Reis, E. M., Machado, G. M. C., Leon, L. L., da Silva, B. O., Ferreira, J. L. P., Amaral, A. C. F., 2009. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from *Lauraceae* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20, 1071-1076.

Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H., Haslam, E., 1988. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27, 2397-2409.

Steffoff, R., 2007. *The Fungus Kingdom*. Marshall Cavendish Corp, Tarrytown, NY.

Sultana, N., Nam, H. L., 2007. Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytotherapy Research* 21, 1171-1176.

Sunenshine, P. J., Schwartz, R. A., Janniger, C. K., 1998. *Tinea versicolor*. *International Journal of Dermatology* 37, 648-655.

Szepietowski, J. C., Baran, E., Wild, E., 2000. *Tinea versicolor*: A prospective study. *Korean Journal of Medical Mycology* 5, 108-112.

Takashima, J., Komiyama, K., Ishiyama, H., Kobayashi, J., Ohsaki, A., 2005. Brosimacutins J-M, four new flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their cytotoxic activity. *Planta Medica* 71, 654-658.

Takashima, J., Ohsaki, A., 2001. Acutifolins A-F, a new flavan-derived constituent and five new flavans from *Brosimum acutifolium*. *Journal of Natural Products* 64, 1493-1496.

Teixeira, A. F., De Carvalho Alcântara, A. F. C., Piló-Veloso, D., 2000. Structure determination by ^1H and ^{13}C NMR of a new flavan isolated from *Brosimum acutifolium*: 4',7-dihydroxy-8-prenylflavan. *Magnetic Resonance in Chemistry* 38, 301-304.

Tempete, C., Werner, G. H., Favre, F., Rojas, A., Langlois, N., 1995. In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyporothramycin B. *European Journal of Medicinal Chemistry* 30, 647-650.

Tinto, W. F., Blyden, G., Reynolds, W. F., McLean, S., 1991. Diterpene and anthraquinone constituents of *Glycydendron amazonicum*. *Journal of Natural Products* 54, 1127-1130.

Torres, S. L., Arruda, M. S. P., Arruda, A. C., Müller, A. H., Silva, S. C., 2000. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. *Phytochemistry* 53, 1047-1050.

Torti, S. D., Coley, P. D., Kursar, T. A., 2001. Causes and consequences of monodominance in tropical lowland forests. *American Naturalist* 157, 141-153.

Tsunoda, K., 1990. The natural resistance of tropical woods against biodeterioration. *Wood Research* 77, 18-27.

Vecht-Lifshitz, S. E., Sasson, Y., Braun, S., 1992. Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 195-200.

Vermes, A., Guchelaar, H. J., Dankert, J., 2000. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 171-179.

Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R., Barnes, S., 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Medica* 76, 1132-1142.

Waechter, A. I., Cavé, A., Hocquemiller, R., Bories, C., Muñoz, V., Fournet, A., 1999. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research* 13, 175-177.

Wang, D., Xia, M., Cui, Z., 2006. New triterpenoids isolated from the root bark of *Ulmus pumila* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 54, 775-778.

Webster, D., Taschereau, P., Belland, R. J., Sand, C., Rennie, R. P., 2008. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 140-146.

Wen, X., Zhang, P., Liu, J., Zhang, L., Wu, X., Ni, P., Sun, H., 2006. Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 722-726.

WHC, 2005. Properties inscribed on the world heritage list, convention concerning the protection of the world cultural and natural heritage. In: UNESCO (Ed.).

White, T. C., Marr, K. A., Bowden, R. A., 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 382-402.

Wingard, J. R., Leather, H., 2004. A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 10, 73-90.

Xin-Min, C., Yoshida, T., Hatano, T., Fukushima, M., Okuda, T., 1987. Galloylarbutin and other polyphenols from *Bergenia purpurascens*. *Phytochemistry* 26, 515-517.

Xiong, L. I., Wang, D., Ming-yu, X. I. A., Wang, Z. H., Wang, W. N., Cui, Z., 2009. Cytotoxic prenylated flavonoids from the stem bark of *Maackia amurensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57, 302-306.

Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M., Sim, K. Y., 1996. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products* 59, 643-645.

Yamada, Y. M. A., Takeda, K., Takahashi, H., Ikegami, S., 2004. Assembled catalyst of palladium and non-cross-linked amphiphilic polymer ligand for the efficient heterogeneous Heck reaction. *Tetrahedron* 60, 4097-4105.

Yang, C. H., Cheng, M. J., Lee, S. J., Yang, C. W., Chang, H. S., Chen, I. S., 2009. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chemistry and Biodiversity* 6, 846-857.

Yang, S. W., Abdel-Kader, M., Malone, S., Werkhoven, M. C. M., Wisse, J. H., Bursucker, I., Neddermann, K., Fairchild, C., Raventos-Suarez, C., Menendez, A. T., Lane, K., Kingston, D. G. I.,

1999. Synthesis and biological evaluation of analogues of cryptolepine, an alkaloid isolated from the suriname rainforest. *Journal of Natural Products* 62, 976-983.

Yoshida, T., Seno, K., Takama, Y., Okuda, T., 1982. Bergenin derivatives from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry* 21, 1180-1182.

Young Han, S., Suck Lee, H., Hye Choi, D., Woon Hwang, J., Mo Yang, D., Jun, J. G., 2009. Efficient total synthesis of piceatannol via (*E*)-selective Wittig-Horner reaction. *Synthetic Communications* 39, 1425-1432.

ANNEXES 1 : ANALYSES STATISTIQUES

Analyse de la corrélation Durabilité naturelle/Activité des extraits par le test du KHI²

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Classe * Actif	120	100,0%	0	,0%	120	100,0%

Classe * Actif Crosstabulation

Count

		Actif		
		N	O	Total
Classe	1,00	14	18	32
	2,00	34	23	57
	3,00	10	6	16
	4,00	15	0	15
	Total	73	47	120

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	13,629 ^a	3	,003
Likelihood Ratio	18,764	3	,000
N of Valid Cases	120		

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,88.

Analyse des médianes des tests CIM obtenus pour chaque catégorie de champignons (1 : Dermatophytes, 2 : levures, 3 lignivores) par le test de Kruskal-Wallis

Ranks

categorie champi	N	Mean Rank
1	56	89,11
2	70	73,73
3	28	63,71
Total	154	

Test Statistics^{a,b}

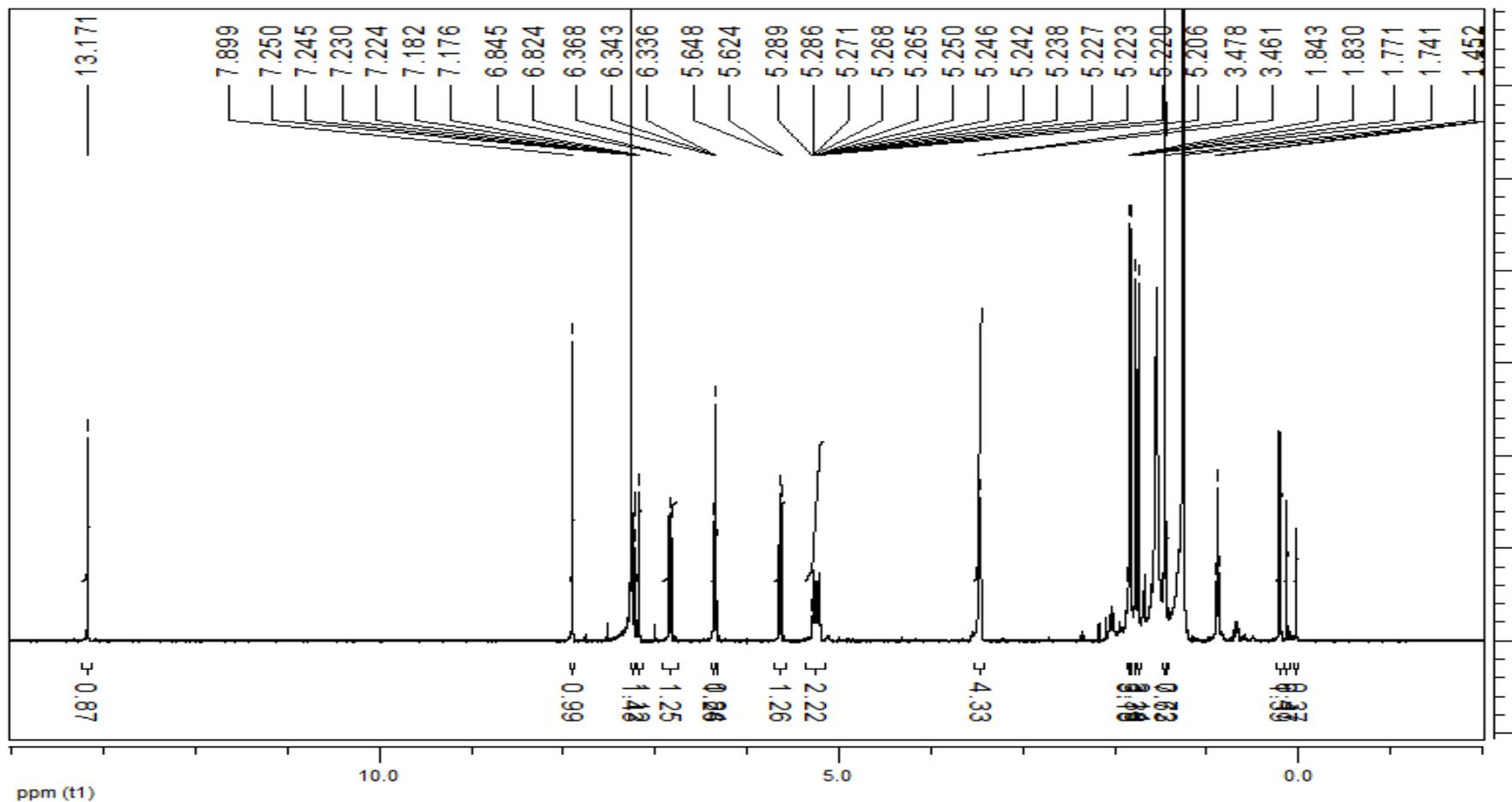
	categorie MIC
Chi-Square	7,232
df	2
Asymp. Sig.	,027

a. Kruskal Wallis Test

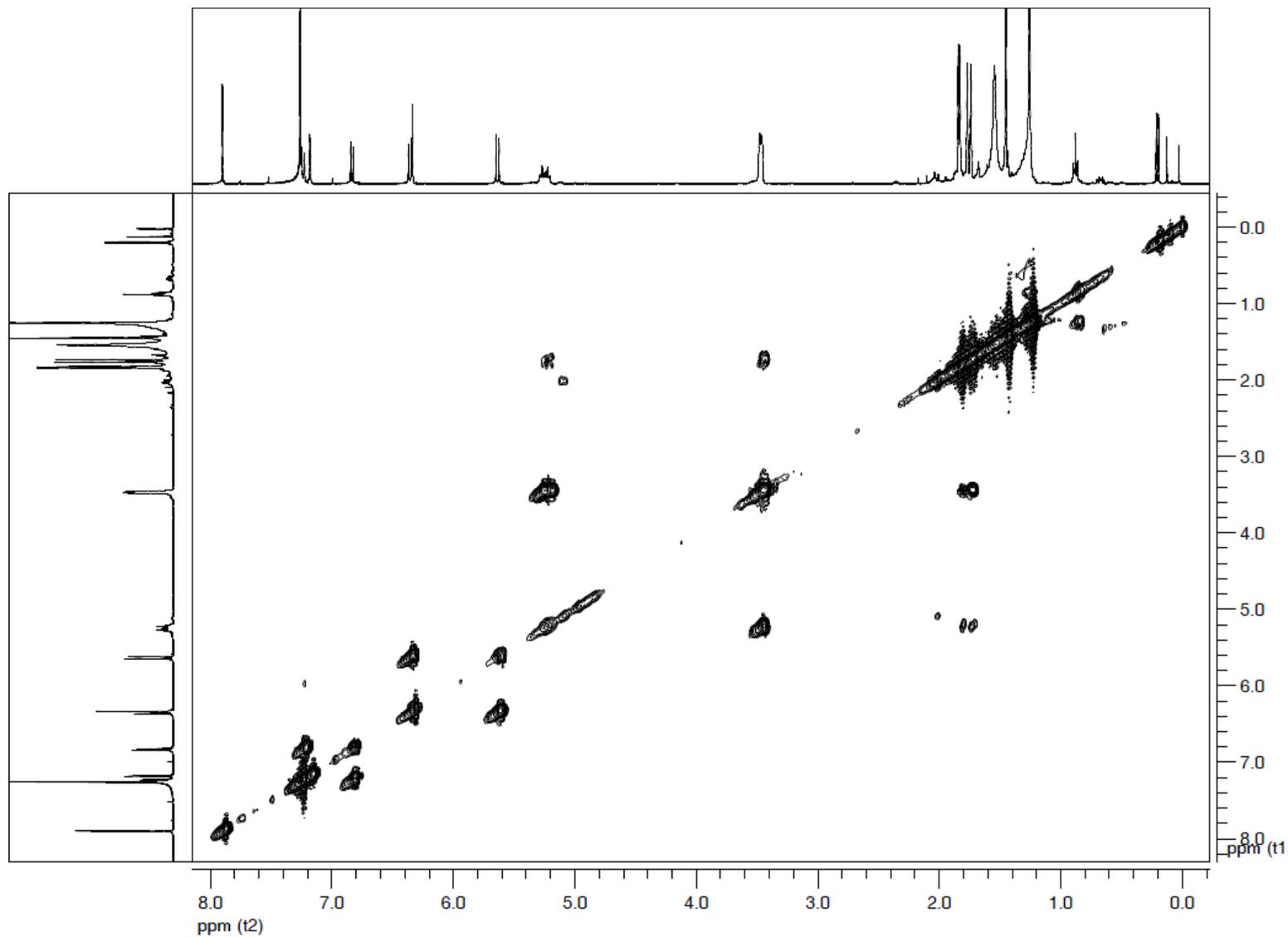
b. Grouping Variable: categorie champi

ANNEXES 2 : SPECTRES RMN

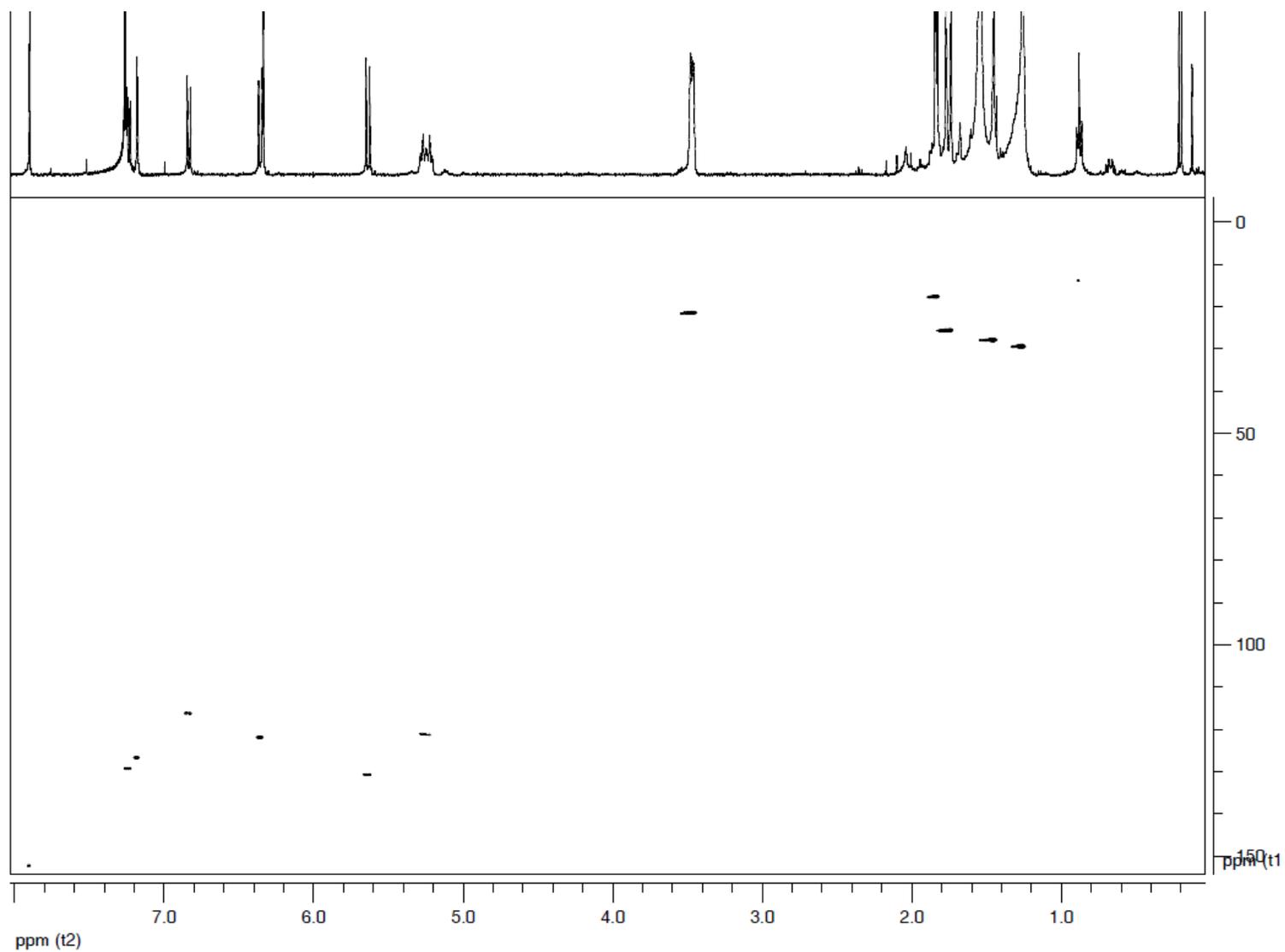
Spectre de RMN ^1H de la spirotropone (SP-11) réalisé dans le CDCl_3



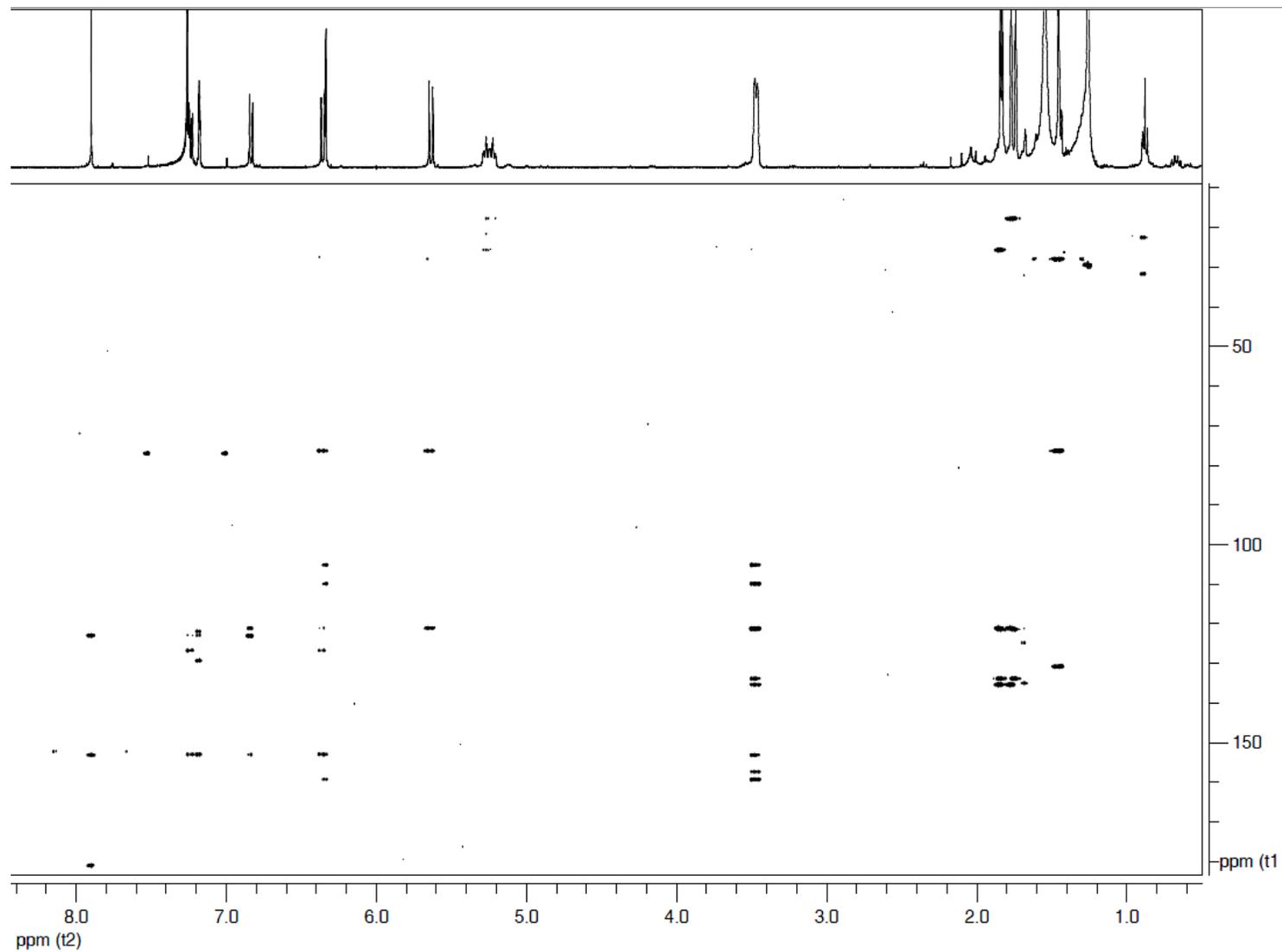
Spectre de COSY de la spirotropone (SP-11) réalisé dans le CDCl_3



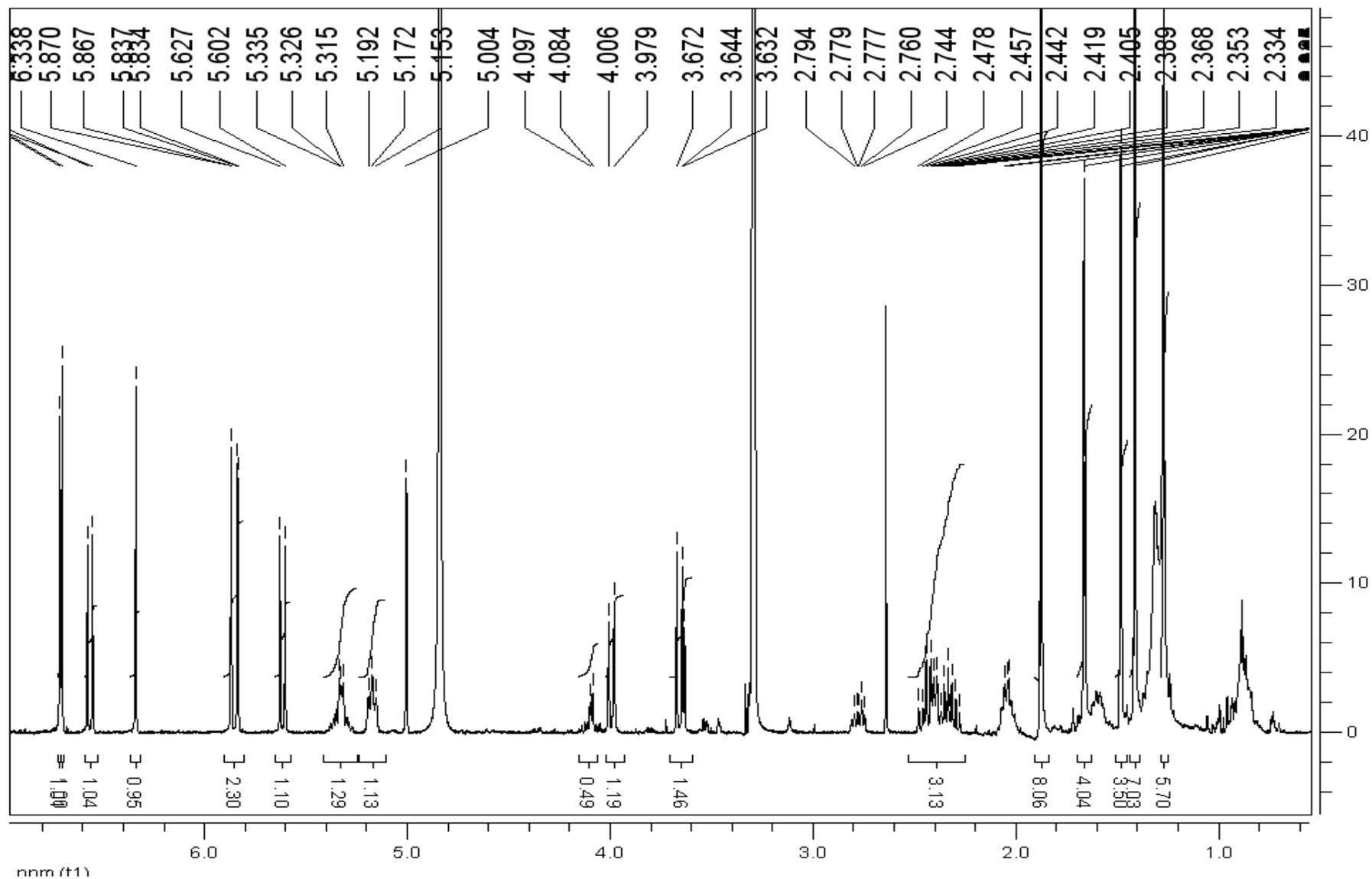
Spectre de HSQC de la spirotropone (SP-11) réalisé dans le $CDCl_3$



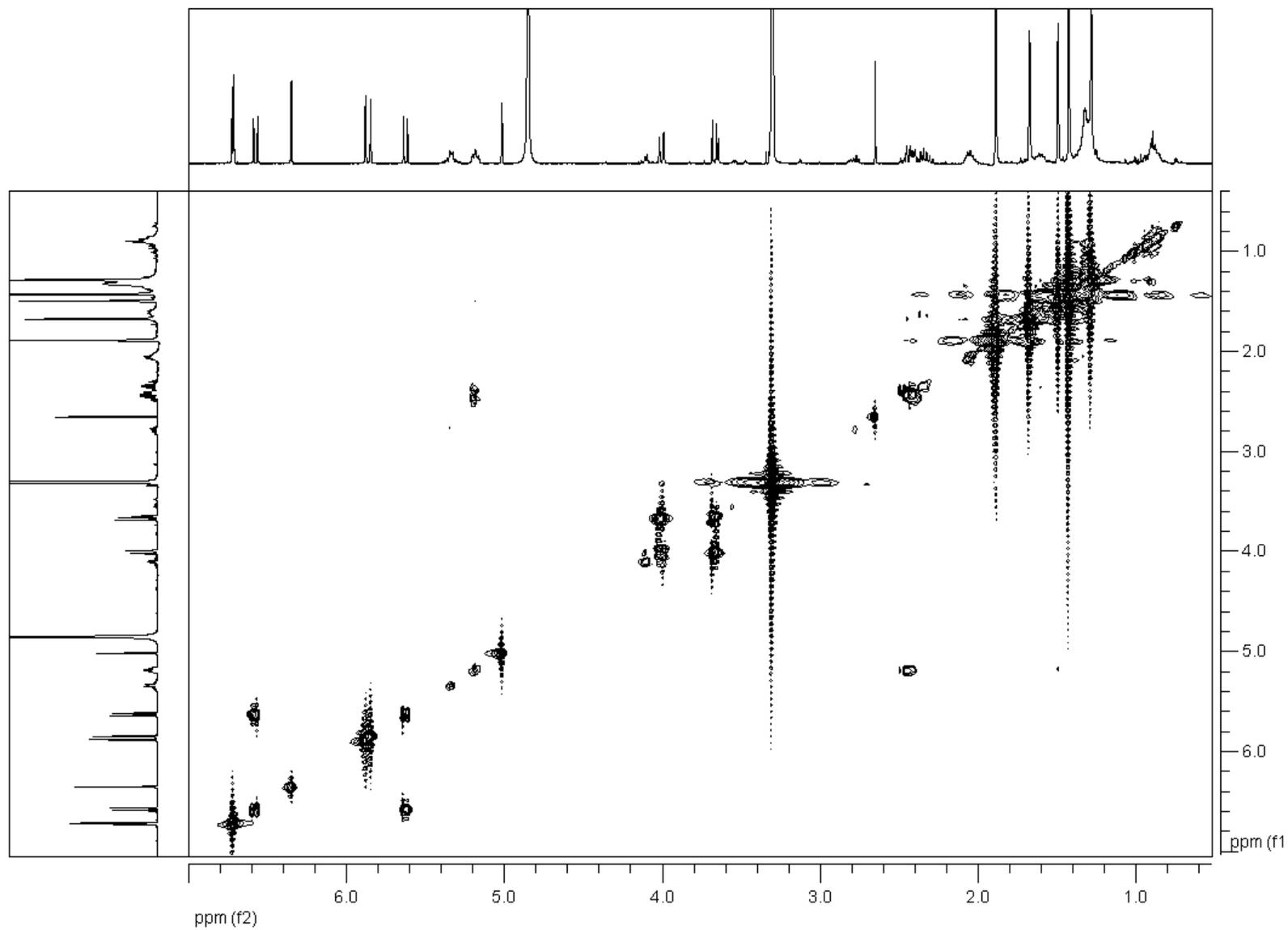
Spectre HMBC de la spirotropone (SP-11) réalisé dans le $CDCl_3$



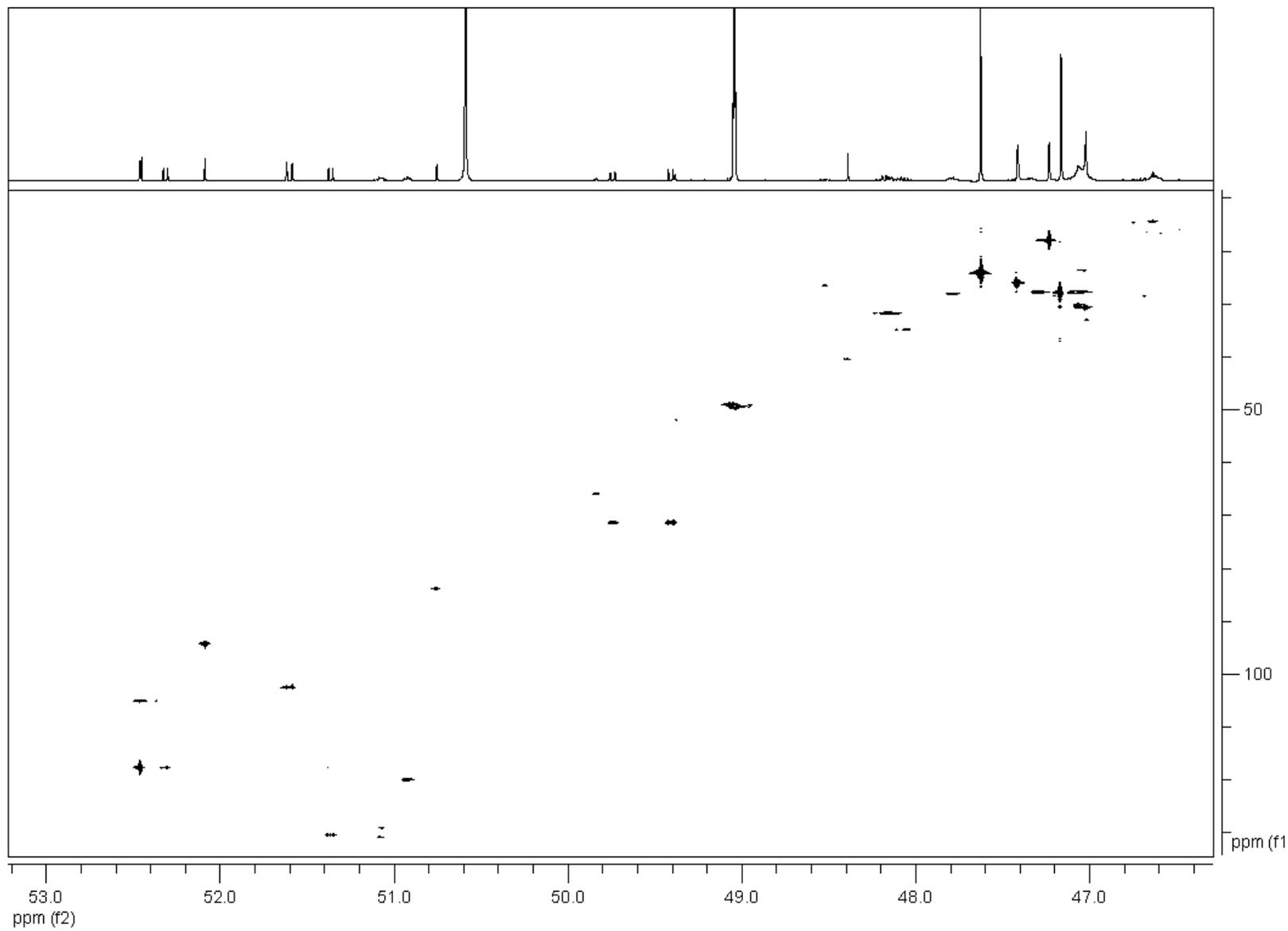
Spectre de RMN ^1H de la spirotropine A (SP-12) réalisé dans le CD_3OD



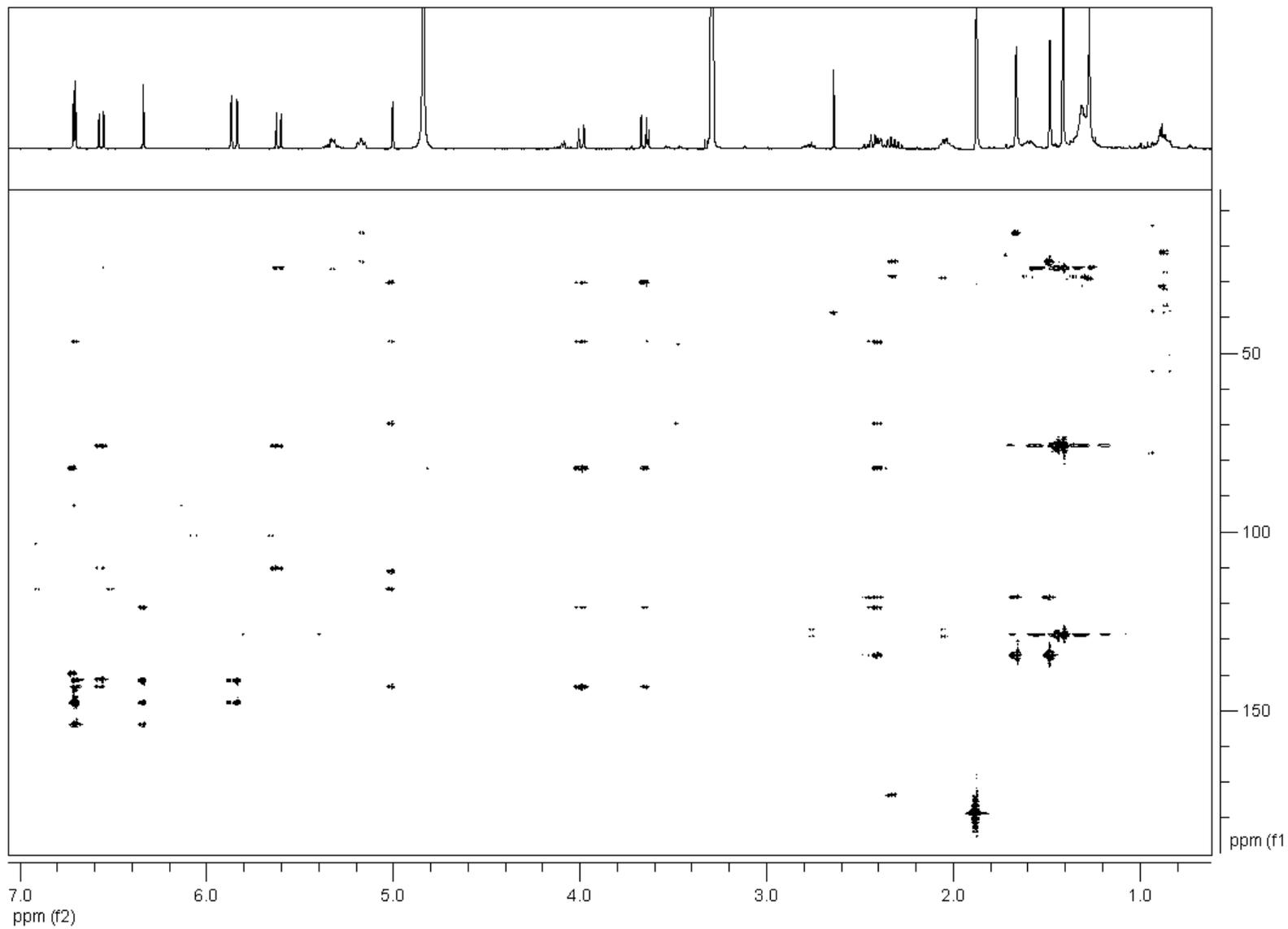
Spectre COSY de la spirotropine A (SP-12) réalisé dans le CD₃OD



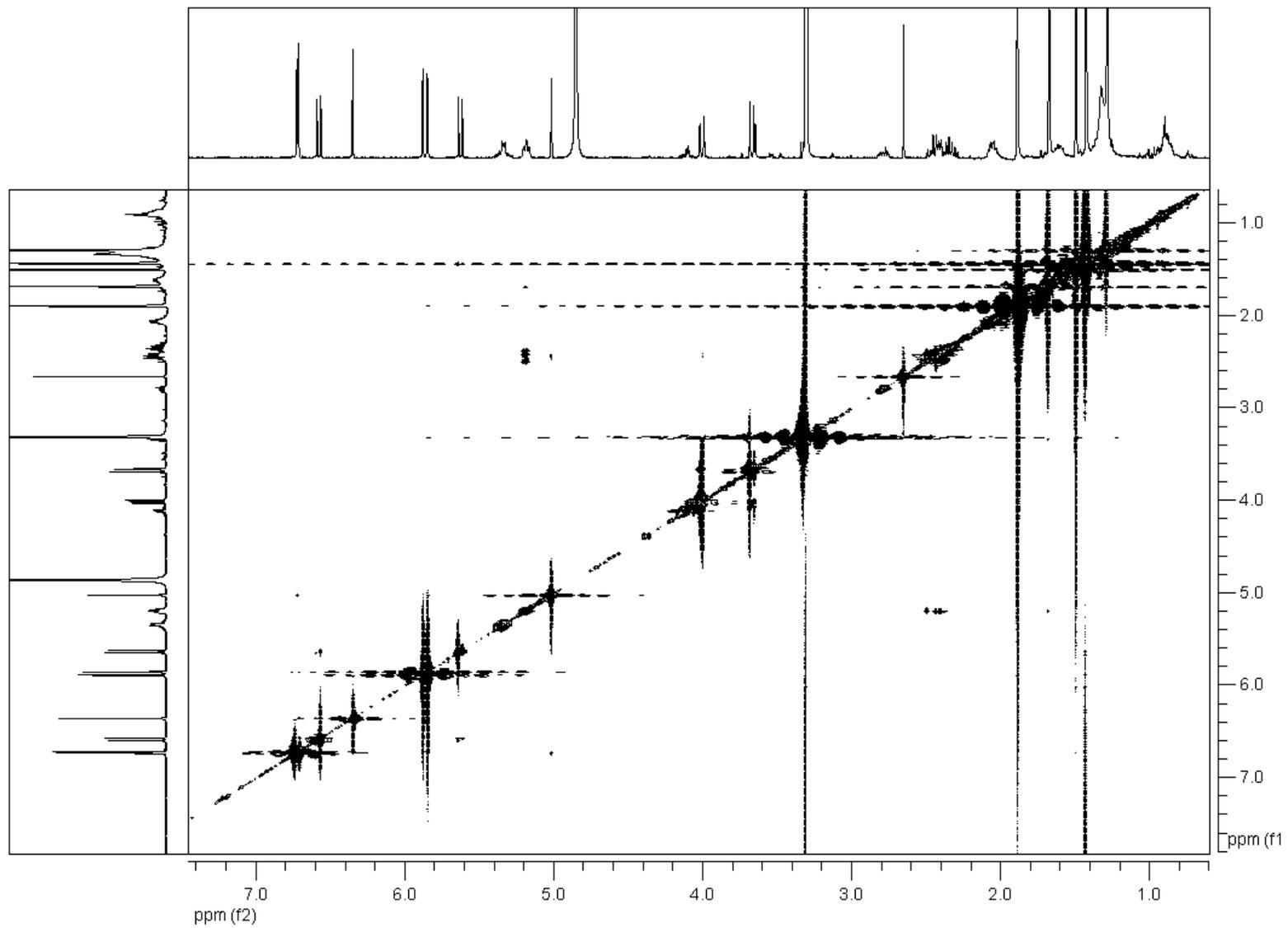
Spectre HSQC de la spirotropine A (SP-12) réalisé dans le CD₃OD



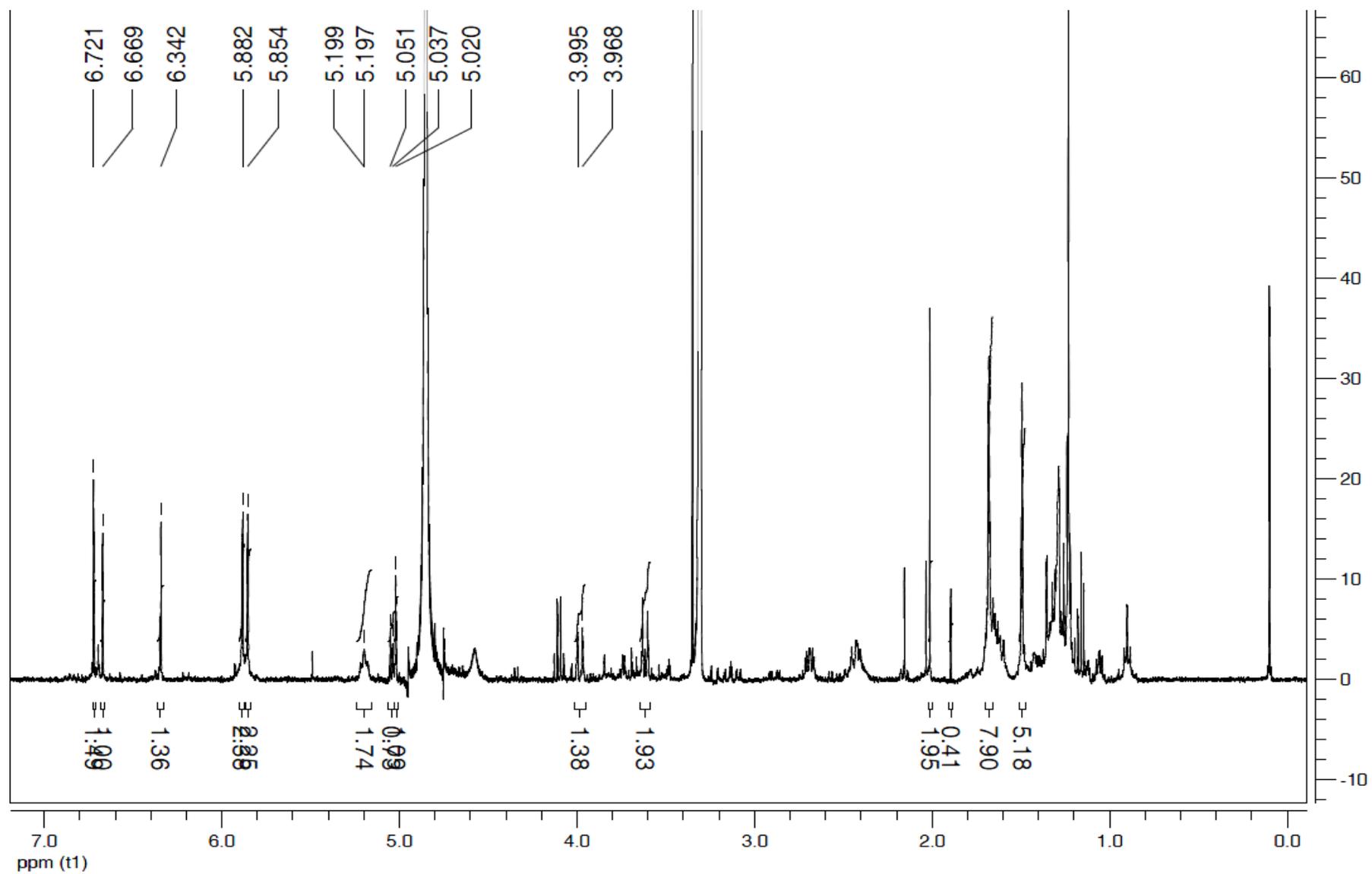
Spectre HMBC de la spirotropine A (SP-12) réalisé dans le CD₃OD



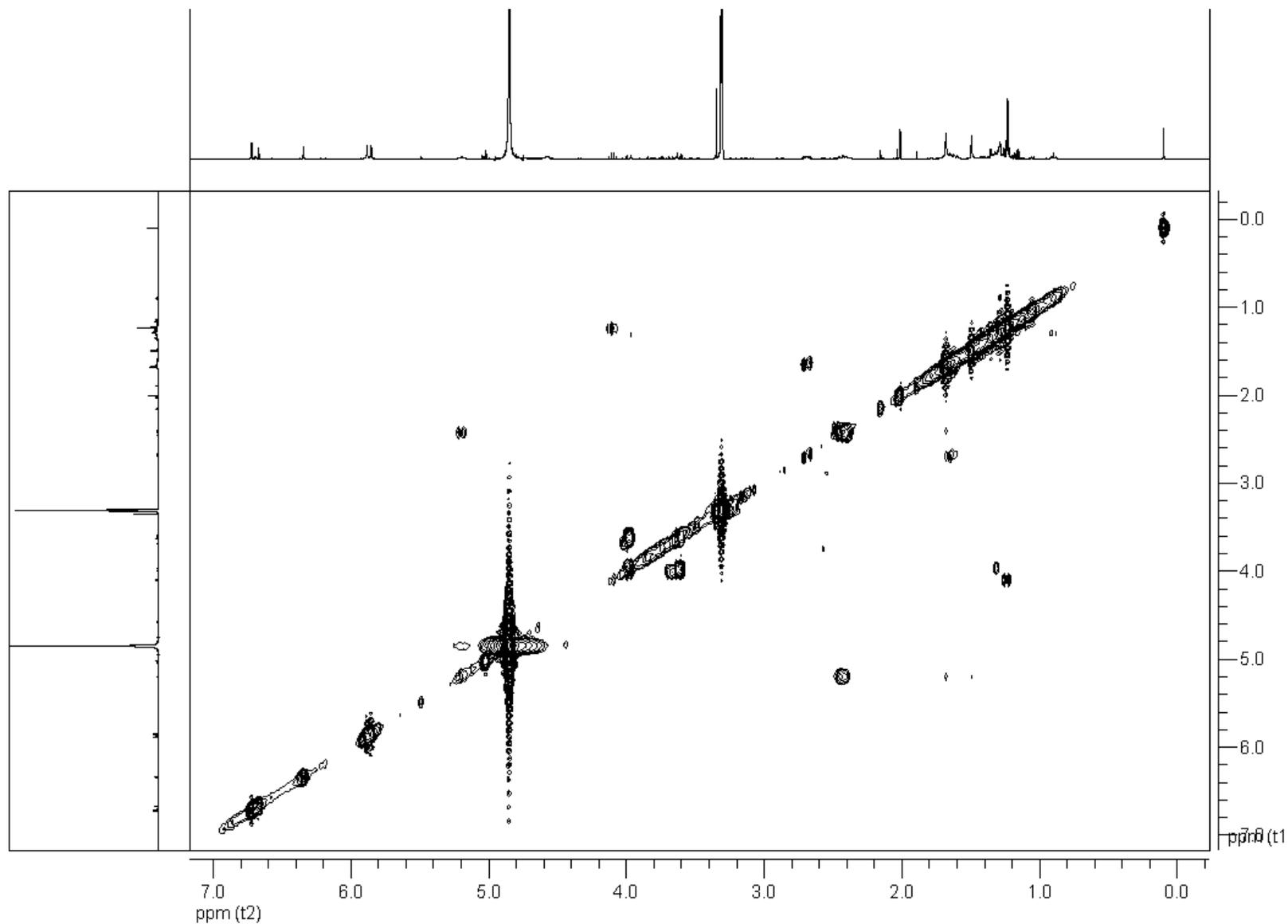
Spectre NOESY de la spirotropine A (SP-12) réalisé dans le CD₃OD



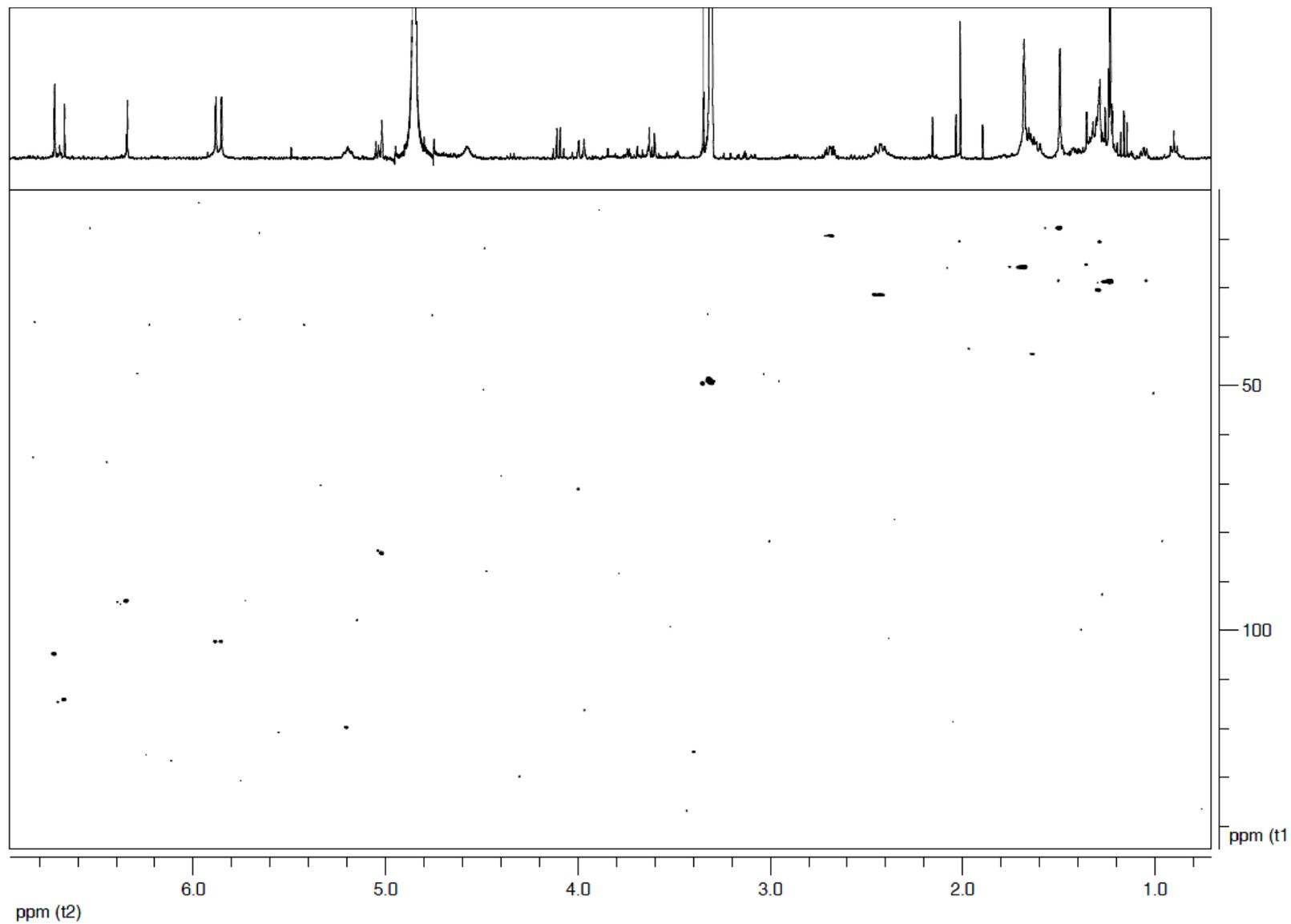
Spectre de RMN ^1H de la spirotropine B (SP-13) réalisé dans le CD_3OD



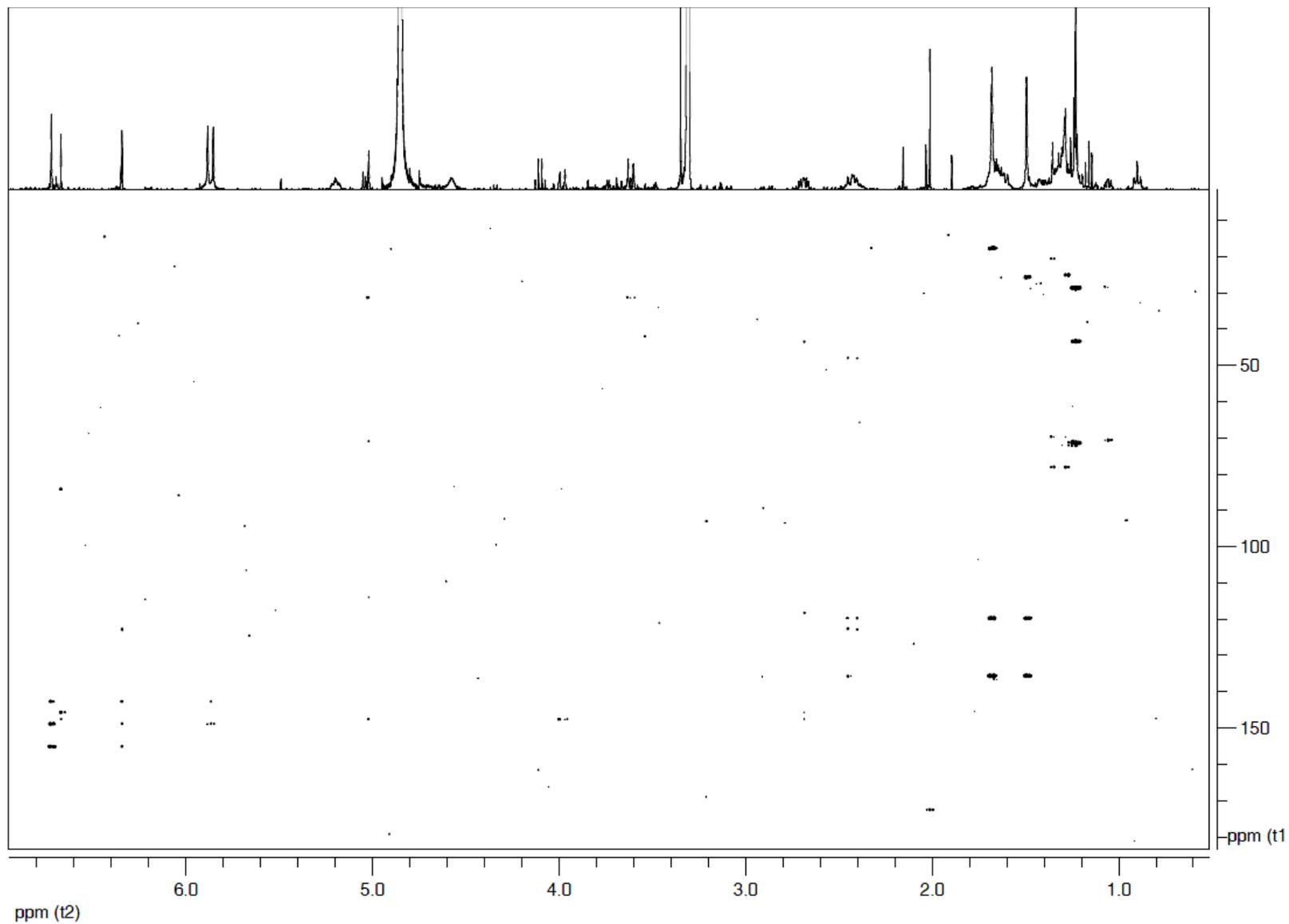
Spectre COSY de la spirotropine B (SP-13) réalisé dans le CD₃OD



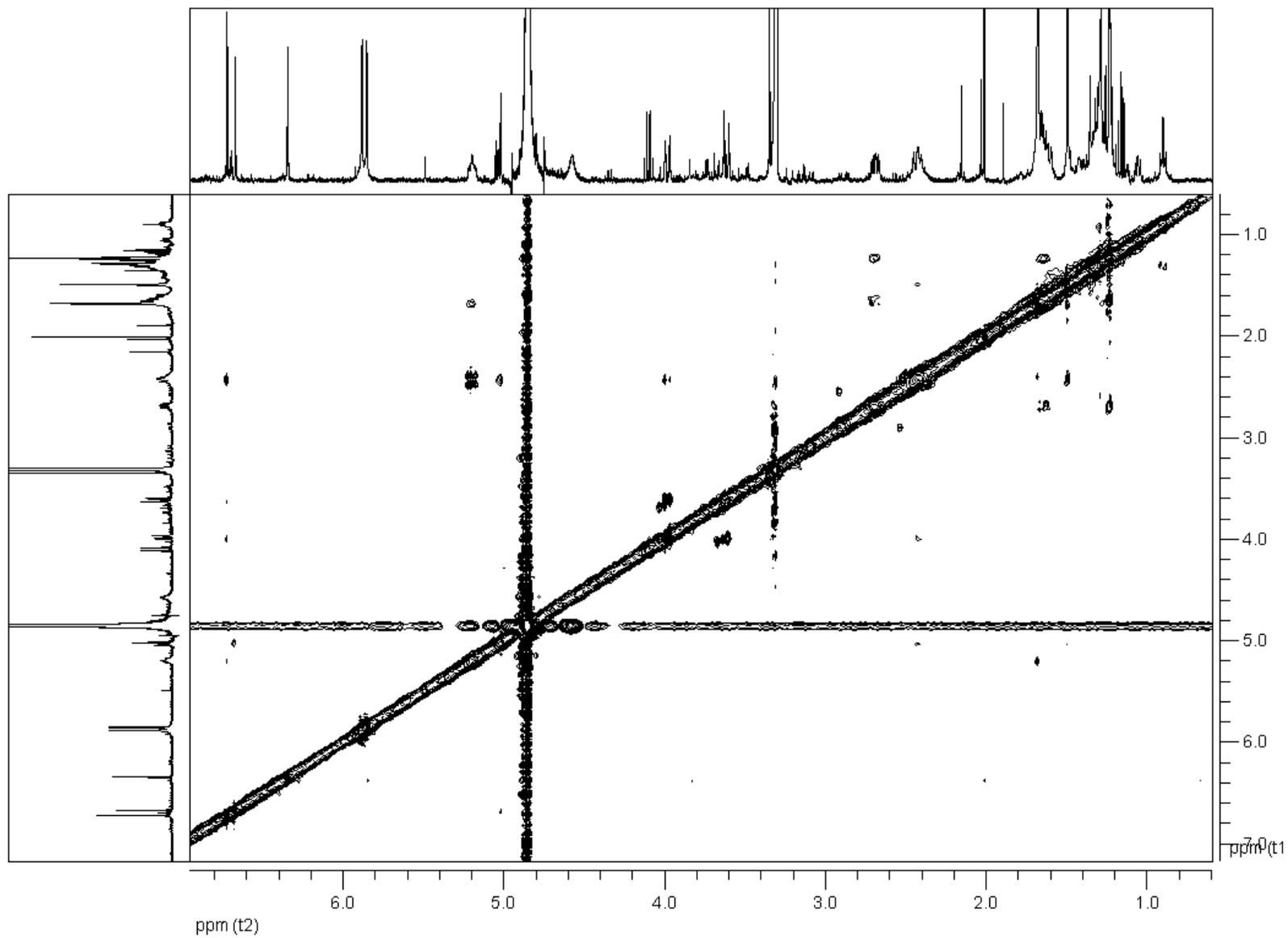
Spectre HSQC de la spirotropine B (SP-13) réalisé dans le CD₃OD



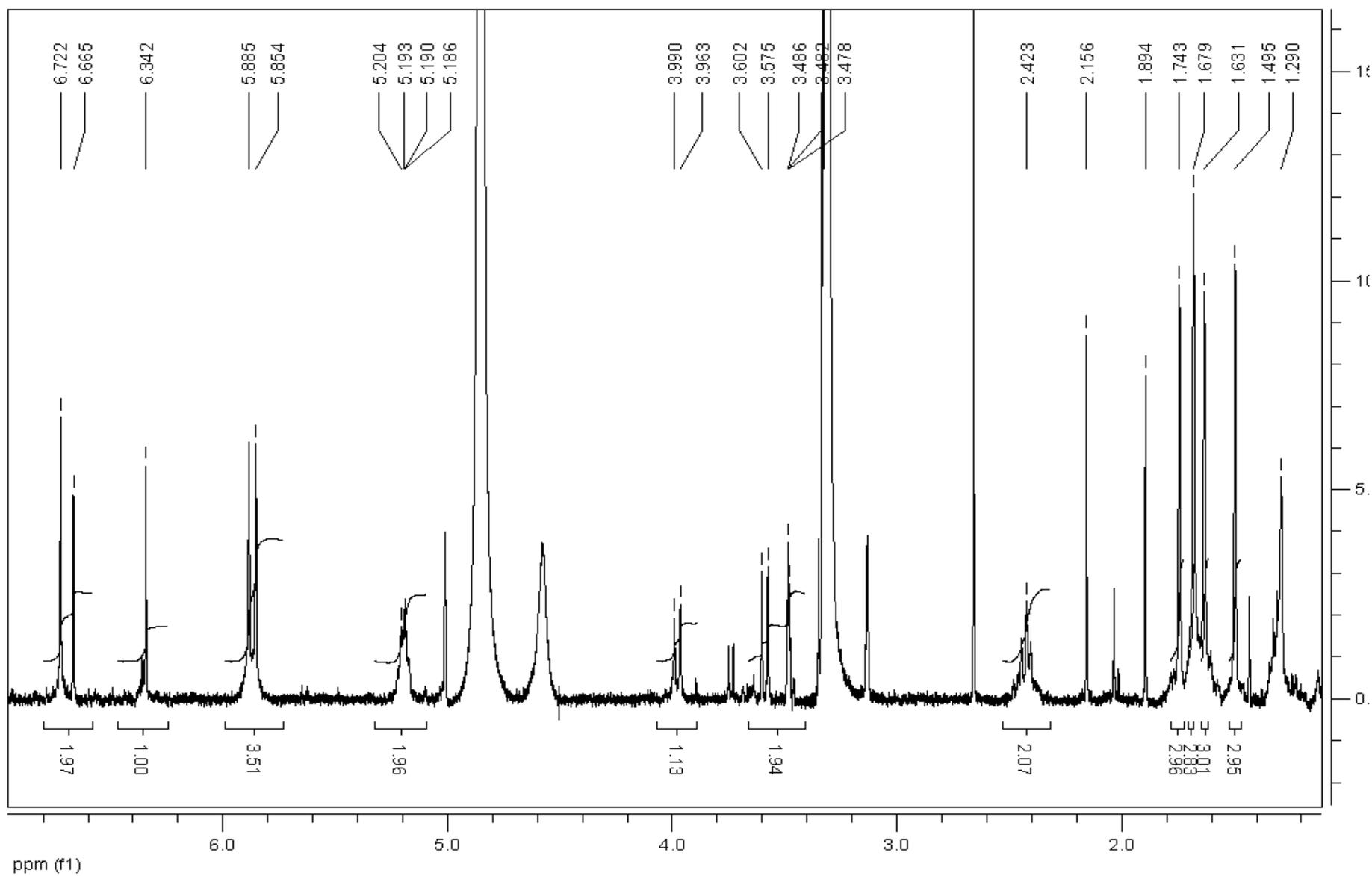
Spectre HMBC de la spirotropine B (SP-13) réalisé dans le CD₃OD



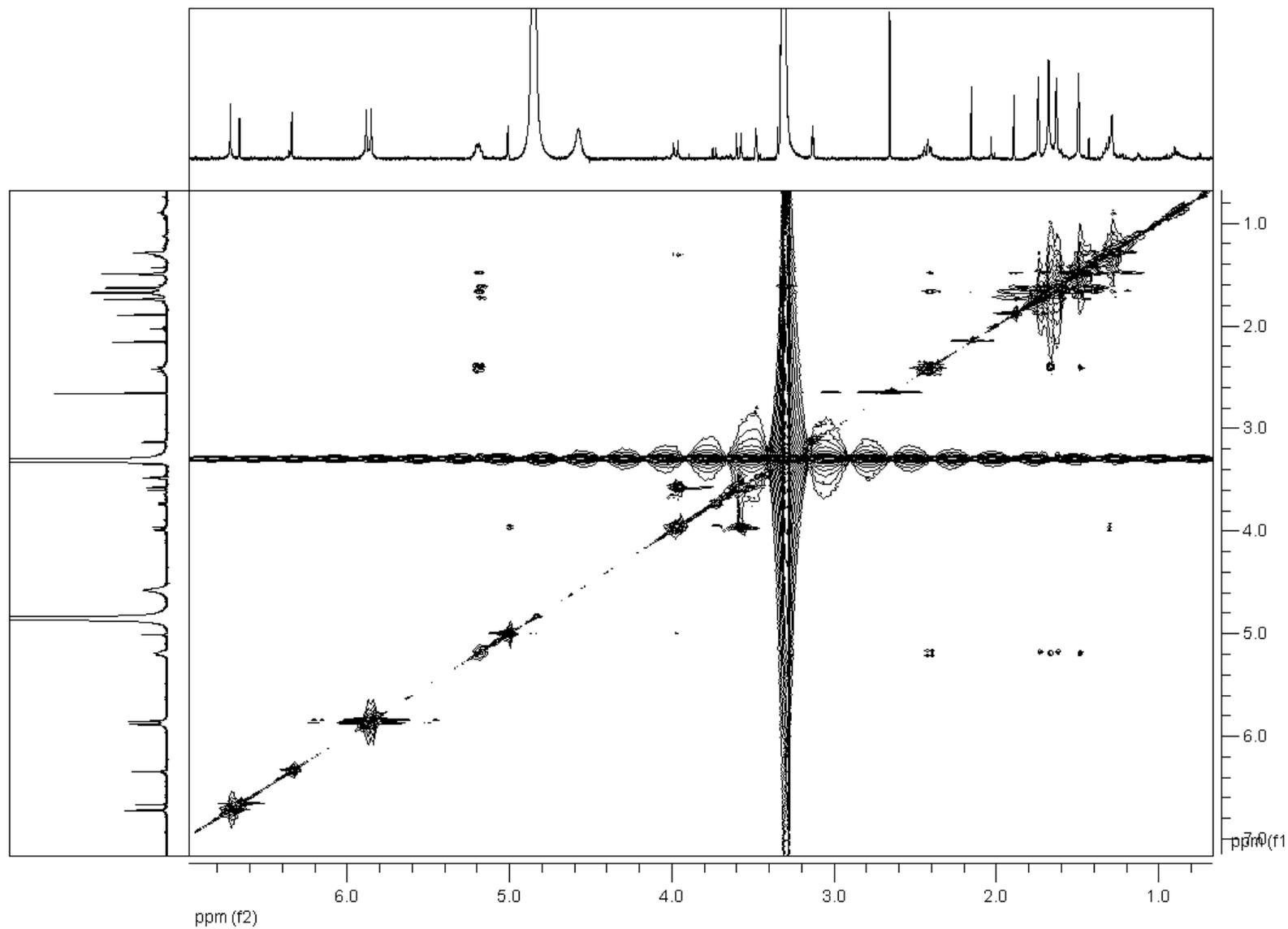
Spectre NOESY de la spirotropine B (SP-13) réalisé dans le CD₃OD



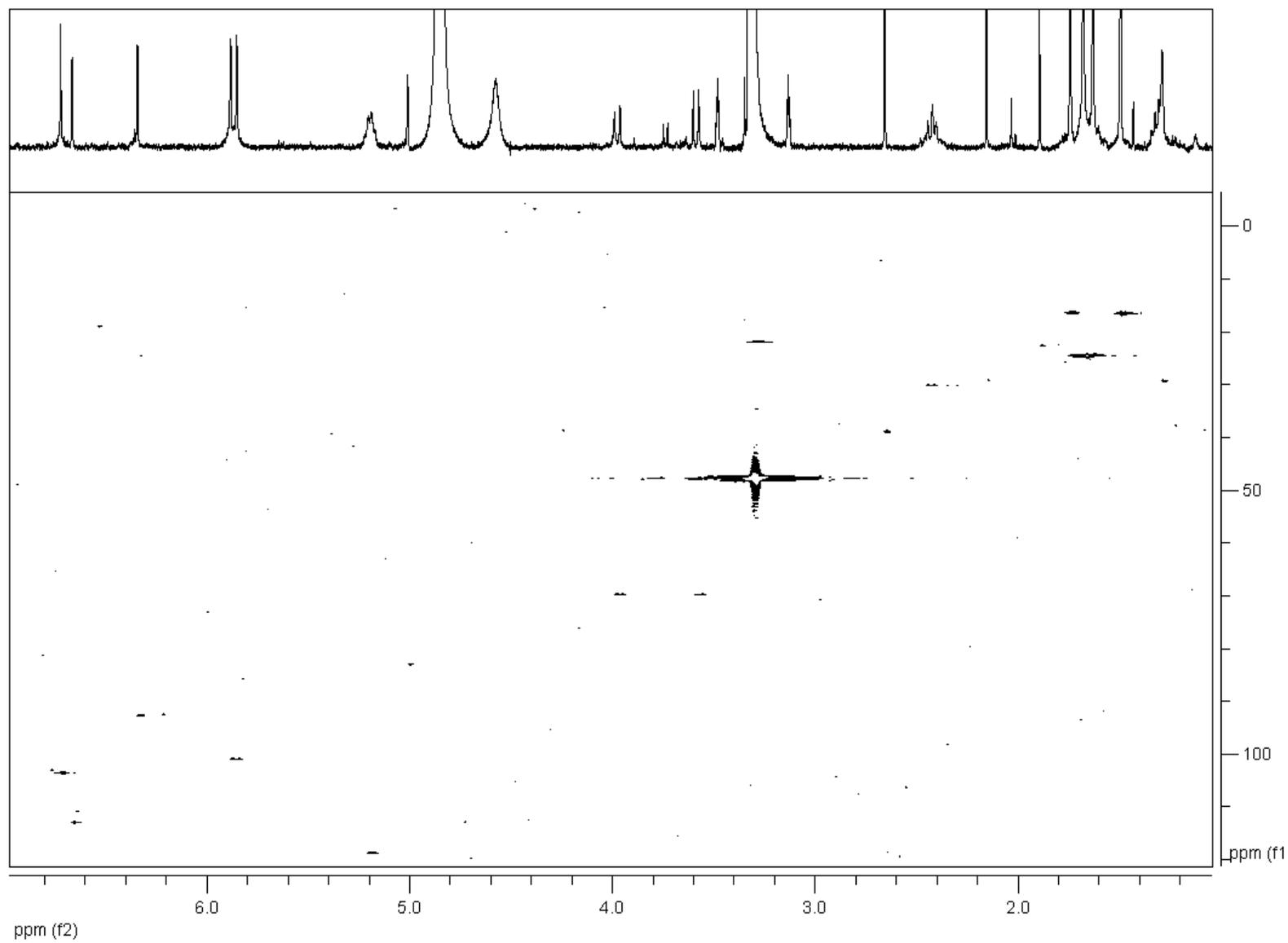
Spectre de RMN ¹H de la spirotropine C (SP-14) réalisé dans le CD₃OD



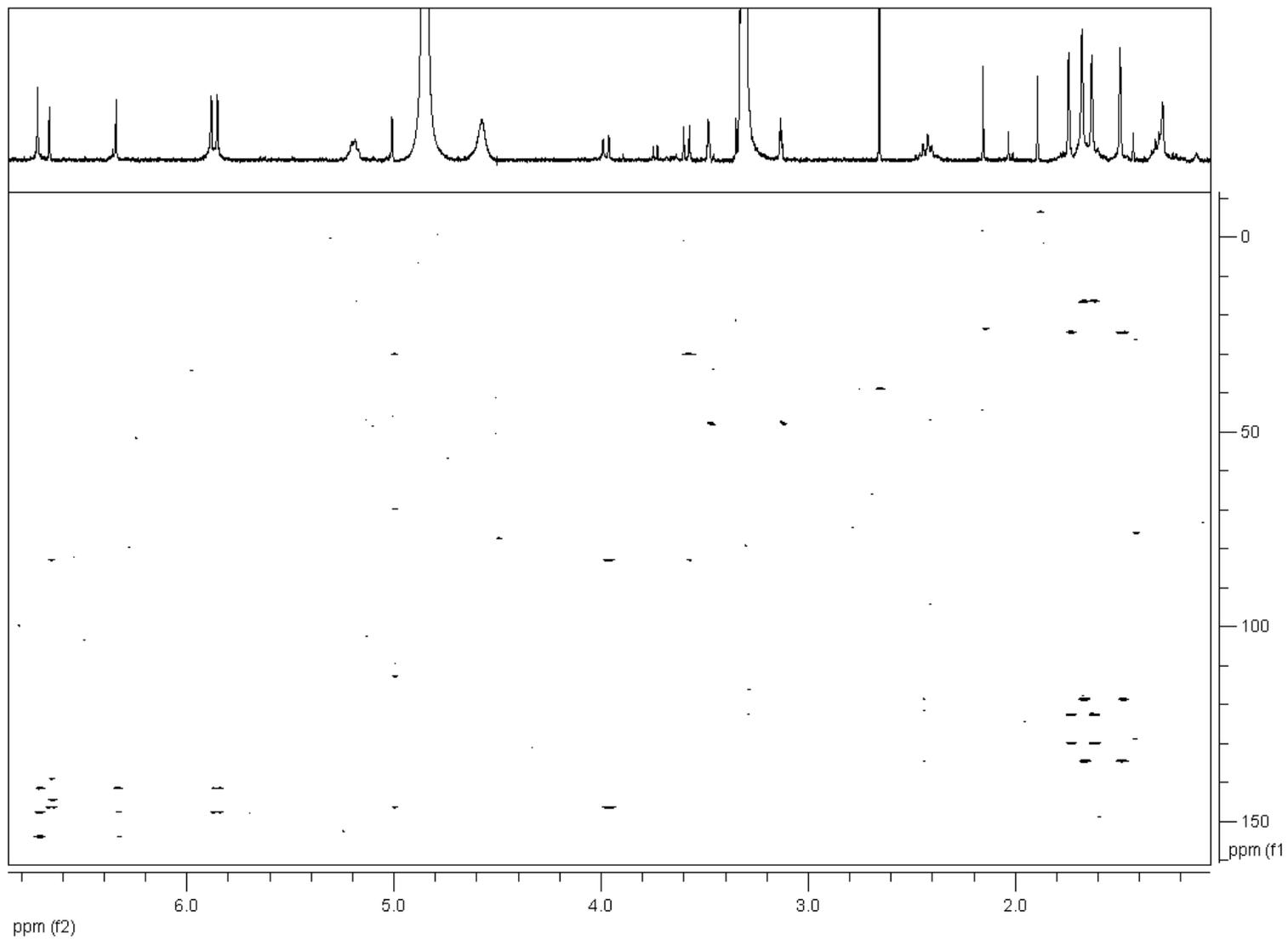
Spectre COSY de la spirotropine C (SP-14) réalisé dans le CD₃OD



Spectre HSQC de la spirotropine C (SP-14) réalisé dans le CD₃OD

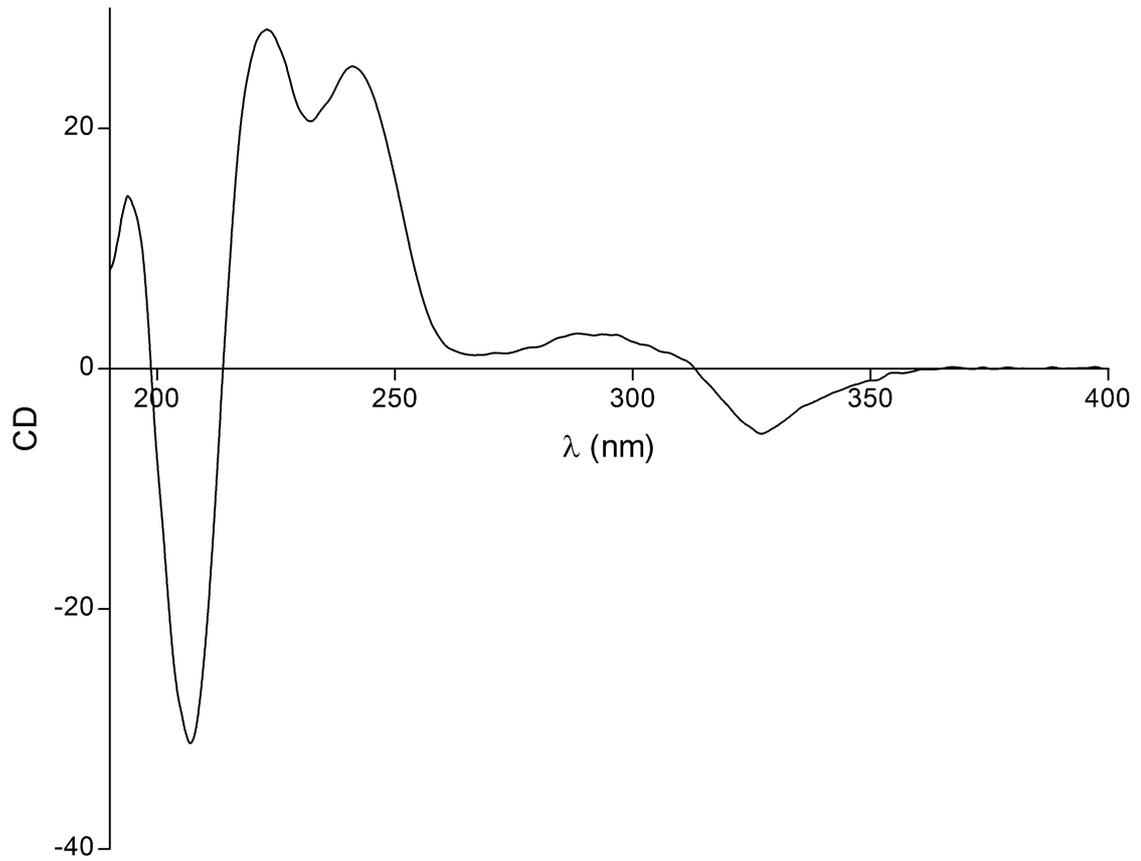


Spectre HMBC de la spirotropine C (SP-14) réalisé dans le CD₃OD

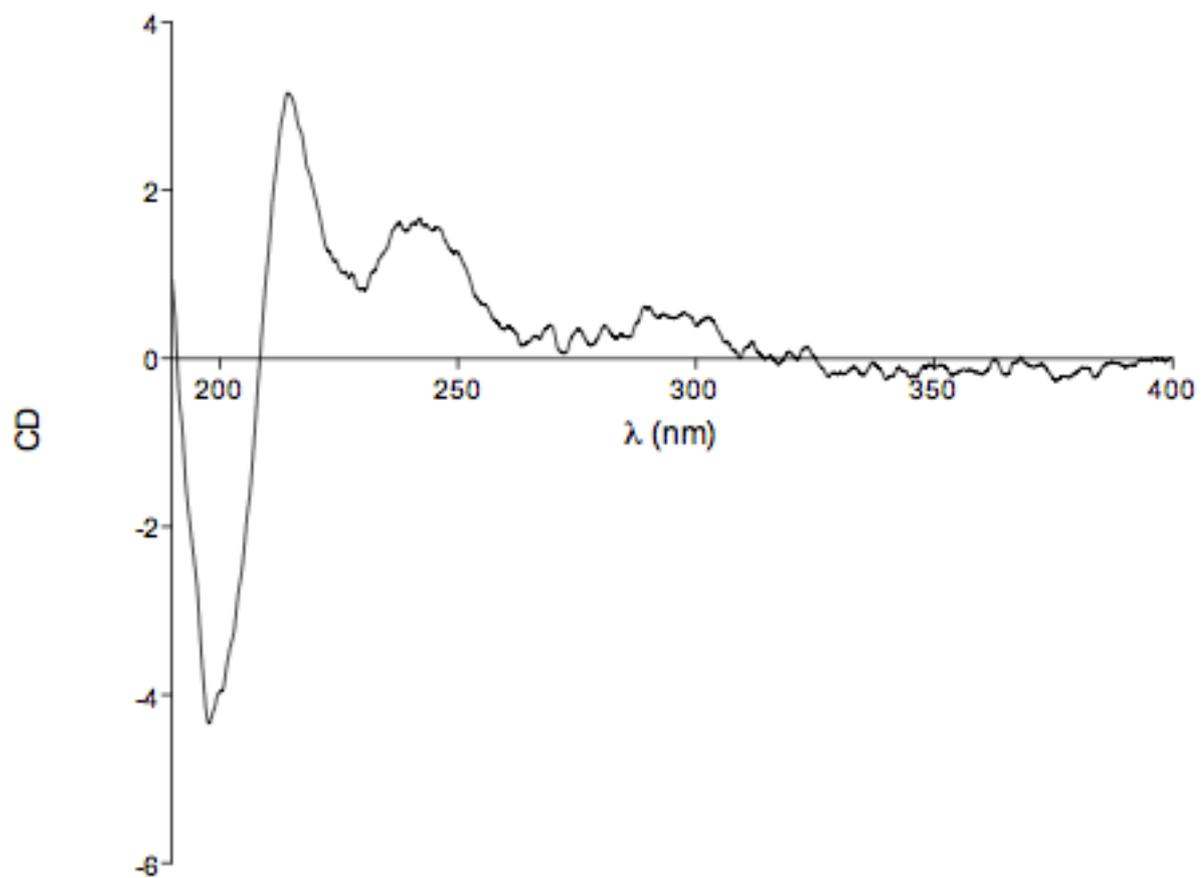


ANNEXES 3 : SPECTRES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE

Spectre de la spirotropine A (SP-12) (MeCN, c 0.001)

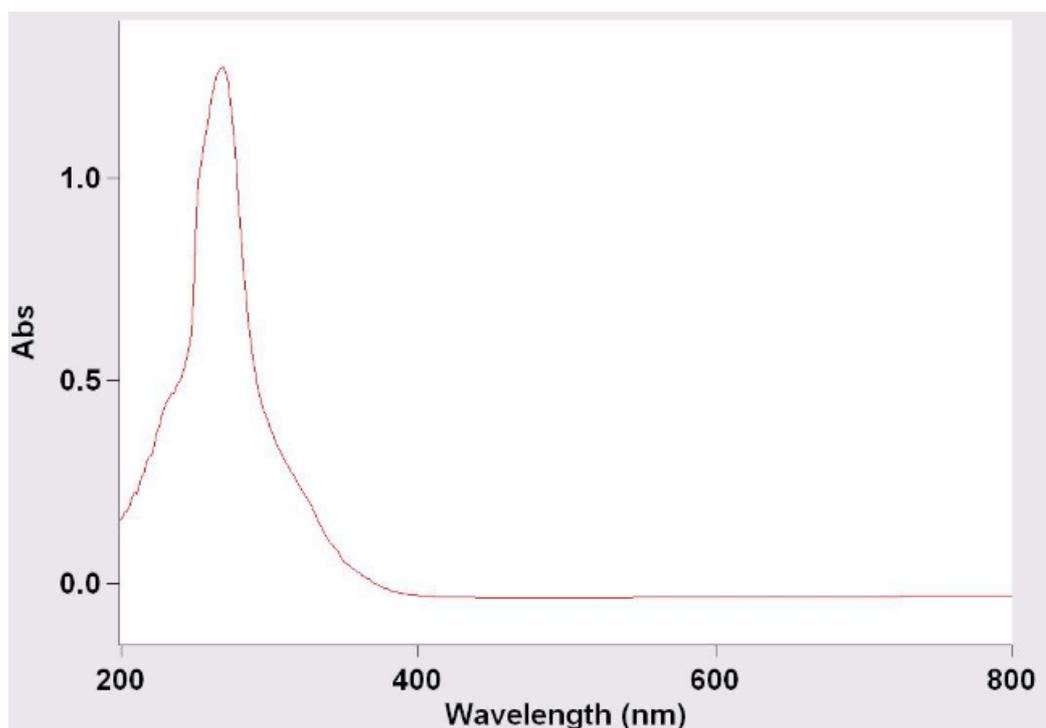


Spectre de la spirotropine B (SP-13) (MeCN, c 0.001)

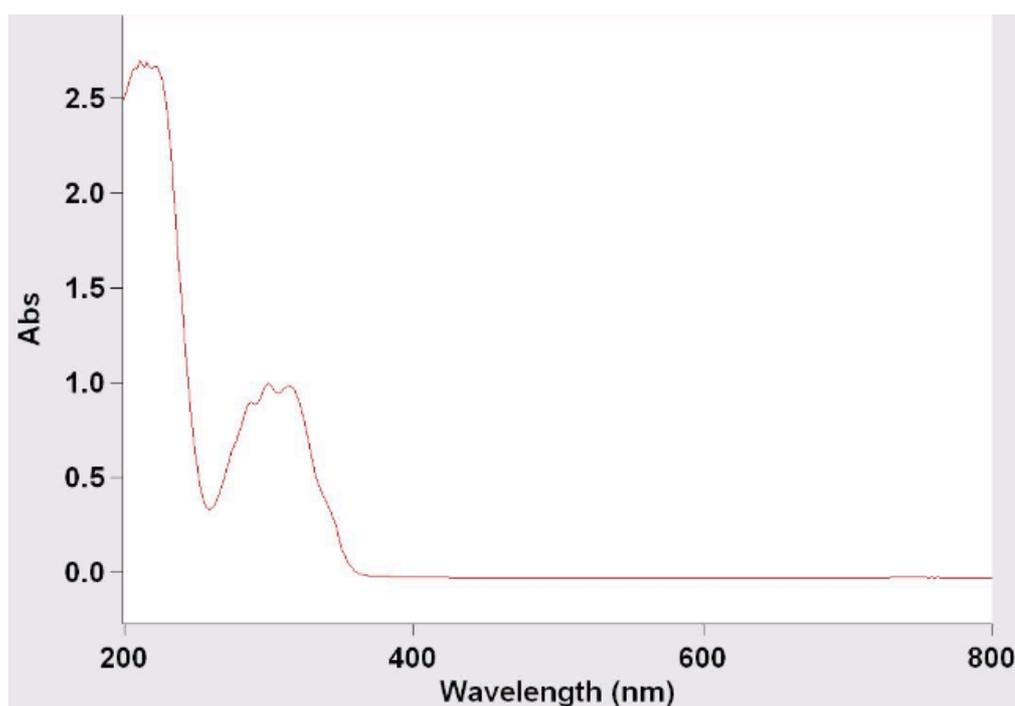


ANNEXES 4 : SPECTRES UV

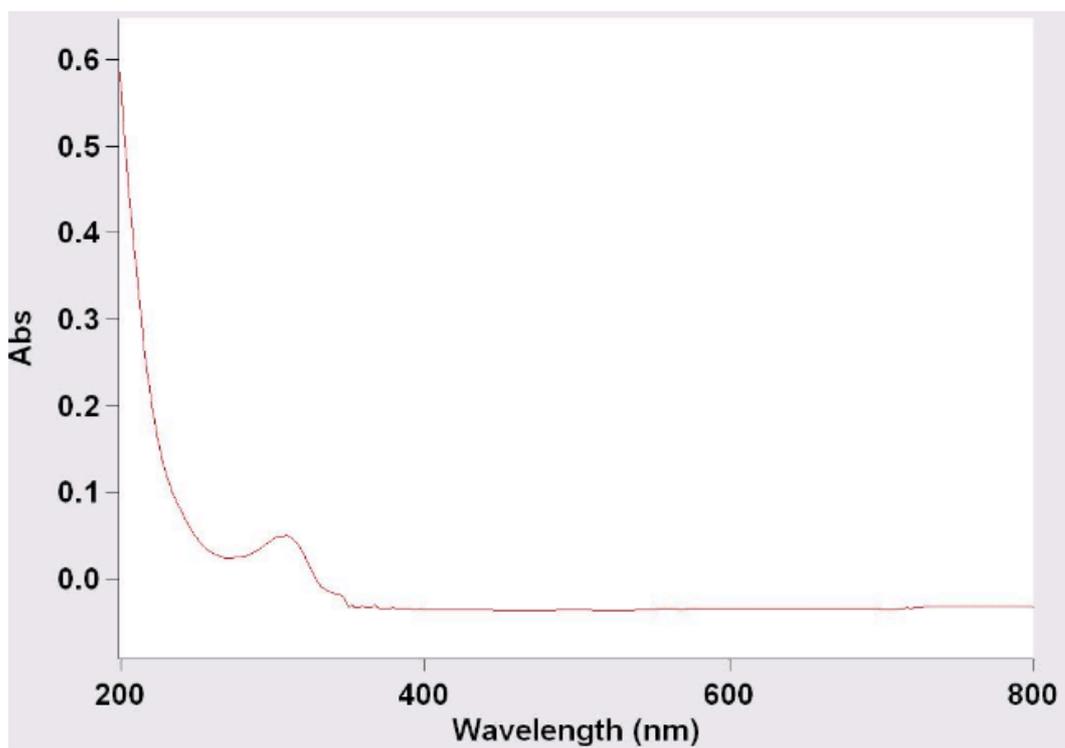
Spectre de la spirotropone (SP-11) (AcOEt)



Spectre de la spirotropine A (SP-12) (MeCN)

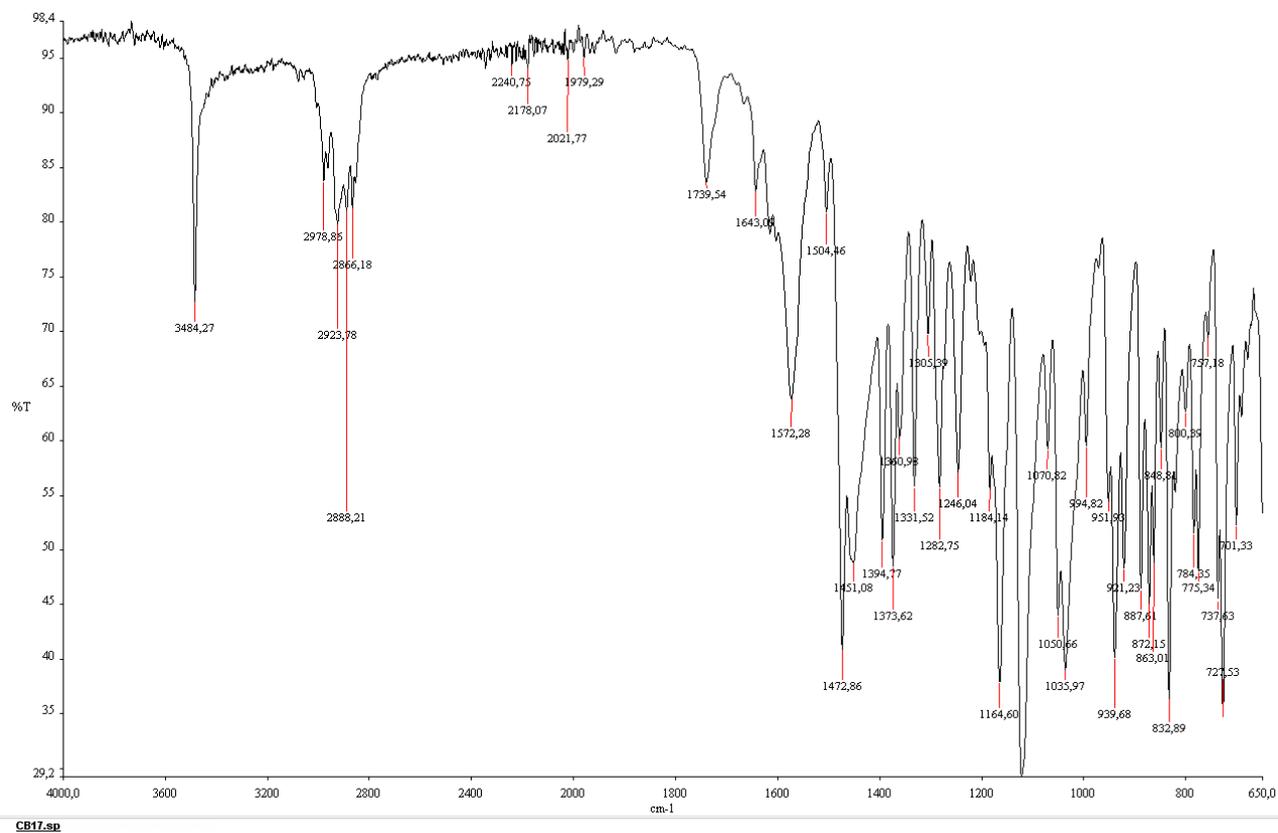


Spectre de la spirotropine B (SP-13) (MeCN)



ANNEXES 5 : SPECTRES IR

Spectre de la spirotropine A (SP-12)



CO-TUTELA INTERNACIONAL DE TESE DE DOUTORADO
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE
FACULTÉ DE SCIENCES, TECHNOLOGIES ET SANTÉ
École doctorale Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques
Spécialité Chimie des Substances Naturelles

CHARLIE BASSET

PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS
PROVENIENTES DE MADEIRAS DURÁVEIS DA AMAZÔNIA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola - Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Didier Stien - Universidade das Antilhas e da Guiana

BRASÍLIA

2011

A valorização dos recursos naturais, e particularmente do bioma Amazônia, constitui um dos desafios principais da humanidade para um desenvolvimento sustentável. A Amazônia, com 6 milhões de km², habitat para 40 000 espécies de plantas (Da Silva *et al.*, 2005) fornece bens essenciais como madeira, alimentos, plantas medicinais e recursos importantes para a pesquisa de medicamentos. Este bioma constitui o maior reservatório de diversidade biológica da biosfera e é considerado Patrimônio mundial da Humanidade pela UNESCO (WHC, 2005).

Em escala molecular, os vegetais ao longo de sua evolução elaboraram estratégias em resposta aos estresses ambientais e à competição (Bednarek e Osbourn, 2009). Particularmente as árvores, que em alguns casos devem perdurar por algumas centenas de anos, adquiriram meios de resistir contra os agentes responsáveis pela biodegradação (Amusant *et al.*, 2007; Nemli *et al.*, 2006). Esses agentes biológicos podem ser de várias origens, como por exemplo, os cupins e os fungos fitopatogênicos. As árvores desenvolveram a capacidade de produzir metabólitos secundários antifúngicos para resistir aos fungos fitopatogênicos (Bednarek e Osbourn, 2009).

Os fungos, além de fitopatógenos podem também causar infecções em humanos. Essas infecções são conhecidas como micoses. É crescente o número de pacientes infectados, devido ao aumento do número de pessoas sensíveis, como pacientes HIV positivos, e à aparição de resistência aos tratamentos disponíveis, particularmente de leveduras do gênero *Candida* (Pfaller e Diekema, 2007).

Os medicamentos utilizados para combater as infecções fúngicas humanas correspondem a tratamentos difíceis e causadores de reações adversas (Kullberg *et al.*, 2011). Dentre as moléculas disponíveis no mercado, os azóis (fluconazol, itraconazol...), as alilaminas (terbinafina, naftifina), as equinocandinas (caspofungina...) e os macrolídeos poliênicos (anfotericina B, nistatina) constituem as principais terapias (Mathew e Nath, 2009). No entanto, esse leque de medicamentos pode ser ineficaz nos casos de resistência dos microorganismos (Martinez-Rossi *et al.*, 2008). Estudos mostraram que o uso de medicamentos em associação poderia ser mais pertinente (Powers, 2004). A associação terapêutica é um meio promissor para permitir o aumento da taxa de cura, diminuindo o desenvolvimento de resistência fúngica e o tempo de tratamento (Venturini *et al.*, 2011).

Os metabólitos secundários que protegem os vegetais contra a degradação por fungos podem tornar-se bons candidatos para o tratamento de infecções fúngicas em humanos.

Os fungos, fitopatogênicos ou patogênicos humanos pertencem ao reino *Fungi* ou *Mycota*. Estes, são organismos heterótrofos em relação ao carbono e se nutrem por absorção de matéria decomposta. Eles não têm raízes e folhas, e o seu aparelho vegetativo, chamado micélio, pode ser unicelular representado pelas leveduras, ou policelular constituído por filamentosos ou hifas. Os fungos apresentam reprodução sexuada, assexuada e eventualmente parassexuada (Hernday *et al.*, 2010).

As doenças fúngicas ou micoses podem variar desde uma infecção superficial até a produção de lesões sistêmicas graves e debilitantes associadas a altas taxas de mortalidade (Chakrabarti e Singh, 2011). Estas são causadas por fungos patogênicos humanos – dermatófitos, forma filamentosa, ou levedura. Geralmente são divididas em 5 grupos, segundo o tecido infectado e o modo de penetração no hospedeiro: (1) infecções superficiais, (2) cutâneas, (3) sub-cutâneas, (4) sistêmicas ou invasivas provocadas por patógenos primários e (5) sistêmicas ou invasivas provocadas por patógenos oportunistas.

As micoses inflamatórias ou dermatofitoses são doenças cosmopolitas e muito freqüentes (Pfaller e Sutton, 2006), que aparecem principalmente nas regiões intertropicais. Estas são popularmente conhecidas como *tinhas*, e recebem denominações especiais de acordo com o local onde se localiza a lesão. São provocadas por fungos queratinofílicos, que secretam queratinases, que degradam a queratina presente nos cabelos, unhas e pele (Baldo *et al.*, 2011). Estas dermatofitoses são causadas por um grupo de fungos denominados dermatófitos constituídos pelos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A prevalência das infecções das unhas atinge taxas de 10 a 20%, segundo o país e as populações, fazendo do seu agente patogênico principal, *Trichophyton rubrum*, um dos fungos infecciosos o mais generalizado (Aly, 1994). *Tinha versicolor (Pityriasis versicolor)* é uma das desordens mais comum no mundo (Sunenshine *et al.*, 1998) provocada pela levedura do gênero *Malassezia*, que induz uma hiper ou hipopigmentação da pele na área afetada, muitas vezes nos braços, pescoço ou barriga (Szepietowski *et al.*, 2000).

Com poucas exceções, as micoses subcutâneas – micetomas, esporotricoses, cromoblastomicoses, etc. – encontram-se confinadas às regiões intertropicais e subtropicais. A transmissão ocorre por meio da inoculação traumática do fungo na pele. O agente

patogênico pode permanecer confinado ao tecido subcutâneo ou derme, mas algumas cepas podem causar lesões graves, podendo afetar os músculos e ossos (Blair, 2007) ; sendo que a imunossupressão é um fator agravante (Lupi *et al.*, 2005).

As micoses sistêmicas ou invasivas provocadas por patógenos primários são infecções graves, pois os fungos podem disseminar-se através da circulação sanguínea e linfática no hospedeiro, causando blastomicoses, coccidioidomicoses e histoplasmoses (Colombo *et al.*, 2011). Os organismos causadores de micoses sistêmicas são intrinsecamente virulentos e atingem pacientes saudáveis (Colombo *et al.*, 2011).

No caso das infecções oportunistas, as espécies de fungos mais frequentes são *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (Dhillon e Clark, 2011) provocando candidíases, criptococoses e aspergiloses.

O tratamento das infecções fúngicas é reunido em cinco grupos, dependendo do mecanismo de ação dos medicamentos (Georgopapadakou e Walsh, 1996). Os azóis, alilaminas e tiocarbamatos atuam interferindo na biossíntese do ergosterol e os polienos interagem com o ergosterol presente na membrana (Mathew e Nath, 2009). O ergosterol é específico das células fúngicas – os animais produzem o colesterol – e, portanto, representa um dos principais alvos para a pesquisa de compostos antifúngicos.

O ergosterol mantém a fluidez e permite a estabilidade da célula fúngica. O funcionamento das enzimas membranares fúngicas como a quitina sintase, crucial para o crescimento e a divisão celular, é dependente da presença do ergosterol, para a manutenção da membrana em sua conformação nativa (Martinez-Rossi *et al.*, 2008).

Quanto à durabilidade natural da madeira, algumas espécies, particularmente angiospermas são capazes de resistir aos agentes de biodegradação, como por exemplo, os insetos e os fungos (Taylor *et al.*, 2006). Essa capacidade pode ser explicada pela presença de metabólitos secundários e outros compostos não estruturais da madeira (Bednarek e Osbourn, 2009).

Os metabólitos são divididos em duas categorias - primários e secundários. Os primários são compostos bio-orgânicos presentes essencialmente em todos os órgãos e constituem as moléculas intermediárias do processo de metabolização. Esses compostos podem ser açúcares simples, aminoácidos, ácidos graxos e ácidos carboxílicos amplamente

distribuídos no reino vegetal. Os metabólitos secundários são geralmente compostos mais complexos, de distribuição taxonômica limitada e a formação no interior do organismo é reversível (Croteau *et al.*, 2000)

Os metabólitos secundários têm várias funções no organismo, e em alguns casos a produção desses compostos é orientada especificamente contra os organismos que degradam a madeira, em particular os fungos (Bednarek e Osbourn, 2009).

Estima-se que existam cerca de 280.000 espécies de vegetais superiores, e 6 vezes mais espécies de fungos (Hawksworth, 2006). Estes fungos são dependentes das plantas para obtenção do carbono como fonte de energia (Barea *et al.*, 2005). A maioria são saprófitos, vivendo sobre os vegetais mortos, degradando-os e reciclando-os em nutrientes disponíveis para os vegetais vivos. Ao longo da evolução, alguns fungos começaram interagir ativamente com os vegetais. A maior parte dessas interações é vantajosa para as plantas, para seu crescimento e desenvolvimento, como por exemplo, as micorrizas e os fungos endofíticos (Grayer e Kokubun, 2001). Uma minoria de espécies de fungos se desenvolveu quebrando o equilíbrio do benefício mútuo, tornando-se organismos patogênicos dos vegetais. No entanto, algumas espécies vegetais são resistentes à infecção e à degradação fúngica, especialmente espécies de árvores (Carneiro *et al.*, 2009; Grayer e Kokubun, 2001).

As interações entre as árvores e seres patogênicos são complexas e podem ser específicas a uma dada espécie de árvore e de fungo. São inúmeras as estratégias de defesas das árvores contra os seres patogênicos, e a utilização de defesas químicas antifúngicas fazem parte dessas táticas (Bednarek e Osbourn, 2009; Grayer e Kokubun, 2001).

Quando um propágulo de fungo entra em contato com a superfície de uma árvore, o microclima (temperatura, umidade, luz, etc.) determina em primeiro lugar sua germinação. Esse elemento de frutificação deve em seguida enfrentar diversas linhas de defesa estabelecidas pela planta hospedeira, antes de atingir uma célula viva. Essas defesas podem ser barreiras mecânicas como uma redução das cutículas; e químicas como a exsudação de compostos capazes de inibir a germinação e o crescimento do fungo. Esses constituintes fazem parte do arsenal de compostos antifúngicos constitutivos produzidos pelas árvores, chamados igualmente proibitinas ou fitoanticipinas, podendo estar presentes em qualquer um dos órgãos (Carneiro *et al.*, 2009). Caso esses compostos constitutivos não sejam suficientes para impedir a penetração das hifas na epiderme, a árvore envolve através de uma “resposta

imunitária”, uma cascata de processos, e acumulam os compostos antifúngicos chamados fitoalexinas (Grayer e Kokubun, 2001).

A durabilidade natural é, em geral, o grau de resistência de uma madeira frente a qualquer alteração de ordem biológica, química ou física. De forma geral, a durabilidade natural da madeira refere-se à resistência aos agentes biológicos, como os fungos, insetos, e demais organismos xilófagos. A resistência aos fungos é avaliada por meio de ensaios padronizados. Na Europa, o protocolo experimental é descrito pela norma NF EN 113 – Produtos de preservação da madeira – Método de ensaio para determinar a eficácia protetora frente aos fungos basidiomicetos lignívoros – Determinação do nível de eficácia (Afnor, 1996). Enquanto a norma NF EN 350-1, Guia dos princípios, ensaios e classificação da durabilidade natural da madeira (Afnor, 1994a) define as classes de durabilidade natural da madeira frente aos fungos lignívoros. Cada classe corresponde a um nível de durabilidade.

A resistência da madeira aos fungos é verificada em amostras de madeira de dimensões determinadas pelas normas, que são colocadas em contato com os fungos, por vários meses, em condições ambientes controladas. A intensidade do ataque dos fungos, e por consequência a resistência natural da madeira, é quantificada pela perda de massa das amostras. É aplicado um coeficiente corretor dependendo da umidade da madeira. A resistência da madeira é estudada em cepas de fungos xilófagos. A classe de durabilidade contra o ataque de fungos xilófagos é avaliada entre 1 e 5: classe 1 “muito resistente”, classe 2 “resistente”, classe 3 “meio resistente”, classe 4 “pouco resistente” e classe 5 “não resistente”. Cada classe corresponde a uma perda de massa da madeira estudada (Afnor, 1994b).

Existem bases de dados que informam a durabilidade natural de um grande número de árvores no mundo, e particularmente do bioma Amazônia (Granato *et al.*, 2005; Scheffer e Morrell, 1998). A durabilidade natural corresponde a capacidade de metabolização de compostos antifúngicos, que leva a formação de uma madeira resistente à degradação (Rodrigues *et al.*, 2010; Schultz e Nicholas, 2000). Assim, esta constatação nos levou a utilizar este modelo bio-inspirado, onde o primeiro aspecto considerado foi o de quanto maior a durabilidade natural de uma árvore, maior seria a produção de compostos antifúngicos. E o segundo aspecto foi o de que o mesmo composto vegetal utilizado pela árvore para se defender contra os fungos xilófagos, poderia também ser usado contra os fungos patogênicos humanos.

Desta forma, é razoável pensar que selecionando árvores especializadas na formação de madeira durável, teremos uma orientação favorável para a descoberta de substâncias possuidoras de atividade em fungos patogênicos humanos. Essa orientação favorável da triagem, graças à observação de fenômenos naturais, aliada à utilização de dados tecnológicos, e aos conhecimentos locais em relação aos usos da madeira na área de construção civil (informação considerada como um indicador de madeira resistente à degradação fúngica), e às considerações baseadas no estado da arte permitiu elaborar um modelo bio-inspirado. Esse modelo foi utilizado para selecionar judiciosamente espécies de árvores para estudo químico-biológico, com o isolamento de substâncias para a identificação estrutural e a avaliação da atividade em dermatófitos e leveduras.

Assim, o objetivo desta tese foi selecionar e coletar espécies de árvores do bioma Amazônia possuidoras de madeiras resistentes a degradação fúngica, a partir das quais se propôs isolar e identificar as substâncias responsáveis pela durabilidade natural e pela atividade em fungos patogênicos humanos. Para tal, foi realizada uma triagem de extratos obtidos a partir do lenho e da casca destas espécies formadoras de madeira imputrescível, quanto à atividade em dermatófitos e leveduras, por meio do método de microdiluição segundo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os extratos ativos foram fracionados por técnicas de cromatografia. As substâncias ativas foram elucidadas e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinados. Outros estudos biológicos foram desenvolvidos, a fim de avaliar o potencial antifúngico e possíveis mecanismos de ação das substâncias promissoras.

As coletas foram conduzidas na Guiana Francesa, uma região ultramarina francesa localizada na América do Sul, com uma superfície de 83.846 km², coberta por 96% de mata equatorial. O território guianense compõe uma das nove regiões ultraperiféricas da União Européia e geologicamente, faz parte da planície das Guianas, delimitada pelo rio Amazonas e o rio Orinoco.

Para cada espécie foi feita uma exsicata, que foi depositada no Herbário da Guiana – IRD (CAY). Os órgãos vegetais foram separados, dessecados em sala climatizada (25°C, 25% de umidade) por duas semanas e, em seguida, pulverizados em moinho de facas. Os extratos foram obtidos pelo processo de extração do material vegetal, por sucessivas macerações em acetato de etila e metanol.

Para avaliação da atividade dos extratos em fungos fitopatogênicos foram usadas duas espécies de fungos lignívoros: *Pycnoporus sanguineus* L. (Murrill) 270 (CTFT) e *Coriolus versicolor* (L.ex Fr) Quélet CTB 863, cedidos pela unidade de pesquisa UR 40 CIRAD, Madeiras Tropicais, Montpellier. Para executar os testes, uma subcultura de cada cepa foi preparada em uma placa de Petri contendo meio de cultura estéril, incubada por pelo menos duas semanas. A atividade dos extratos em fungos lignívoros foi verificada por microdiluição.

Para avaliação da atividade dos extratos em fungos patogênicos humanos foram usadas cepas ATCC e isolados clínicos – dermatófitos: *Microsporium gypseum* (M.g. LMGO 10 e M.g. LMGO 533), *Microsporium canis* (M.c. LMGO 02 e M.c. LMGO 25), *Trichophyton rubrum* (T.r. LMGO 06, T.r. LMGO 08 e T.r. LMGO 4218) e *Trichophyton mentagrophytes* (T.m. LMGO 09); e leveduras: *Candida albicans* (C.a. ATCC 10231 e C.a. LMGO 102), *Candida parapsilosis* (C.p. ATCC 22019 e C.p. LMGO 05), *Candida glabrata* (C.g. LMGO 44), *Candida krusei* (C.k. LMGO 174), *Candida tropicalis* (C.t. LMGO 35), *Cryptococcus neoformans* (C.n LMGO 02) e *Cryptococcus gattii* (C.g. LMGO L1). LMGO (Laboratório de Micologia de Goiás) corresponde a fungos isolados clínicos de pacientes do Hospital da Universidade Federal de Goiás. Para executar os testes, uma subcultura de cada cepa foi preparada em um tubo de ensaio de vidro contendo meio de cultura estéril, incubado por pelo menos dois dias para as leveduras e cinco dias para os dermatófitos. A atividade dos extratos em fungos patogênicos humanos foi verificada por dois métodos: teste de perfuração em ágar e microdiluição em meio líquido.

Para avaliação citotóxica dos extratos foram utilizadas células das linhagens MRC5 (pulmão fetal humano), MDA-MB-435 (melanoma) e KB (carcinoma cervical), provenientes do banco de células do serviço de citotoxicidade do Instituto de Química de Substâncias Naturais (ICSN/CNRS) – Gif sur Yvette, França. As substâncias que apresentaram atividade antifúngica foram testadas em células MRC5 e MDA-MB-435, a fim de determinar o índice de seletividade – valor de IC₅₀ sobre as células / valor de CIM sobre os fungos. A fim de ampliar as informações sobre citotoxicidade e verificar a possibilidade de atividade destas substâncias em células cancerígenas, as que não foram ativas em fungos foram testadas em células KB, onde a atividade antiproliferativa foi calculada em porcentagem a uma concentração de 10⁻⁵M, segundo trabalhos de (Tempete *et al.*, 1995).

Para medir a sensibilidade dos fungos lignívoros, dermatófitos ou leveduras em presença dos extratos, foi utilizada uma versão ligeiramente modificada do método de

perfuração em ágar descrito por (Karou *et al.*, 2006). A atividade de cada extrato foi avaliada segundo a presença ou ausência de halos de inibição do crescimento fúngico. Estes halos foram medidos com uma régua milimetrada, em quatro direções considerando-se como medida final o menor diâmetro.

O teste de microdiluição em meio líquido, adaptado segundo as normas CLSI – protocolos M38-A2 (dermatófitos) e M27-A3 (leveduras) (CLSI, 2008a, b) permitiu determinar a suscetibilidade dos extratos e substâncias isoladas em fungos. O CIM, expresso em $\mu\text{g/mL}$ foi determinado como a concentração correspondente ao último poço onde o crescimento fúngico foi visivelmente nulo. Os extratos foram considerados ativos em valor de $\text{CIM} \leq 250 \mu\text{g/mL}$, e as substâncias isoladas em CIM de $64 \mu\text{g/mL}$.

O fracionamento dos extratos selecionados ativos foi feito por cromatografia em coluna de gel de sílica em um sistema de eluentes contendo hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de cromatografia de sílica gel Merck®, reveladas com ácido fosfomolibdico 5% em etanol. As purificações das substâncias por CCD preparativas foram realizadas em placas de cromatografia de sílica Partisil Merck®. As purificações das substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas com um equipamento Waters®, assim como as cromatografias CLAE analíticas. Foi utilizada para as purificações uma coluna de fase reversa C_{18} preparativa e para a análise uma coluna de fase reversa C_{18} . Foram ainda utilizadas colunas de poliamida para retirar macromoléculas de alguns extratos.

As identificações moleculares foram feitas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN Varian® 400 MR). Os espectros de hidrogênio foram registrados em 400 MHz e os espectros de carbono em 100,6 MHz. Os espectros de massa de alta resolução foram feitos com um aparelho Bruker (UltrOTOFT-Q, Bruker® Daltonics, Billerica, MA). Os demais experimentos analíticos foram as análises de poder rotatório (aparelho Anton Paar® MCP 300), UV (aparelho Varian® CARY 100), infravermelho (aparelho FT-IR PerkinElmer® Spectrum 100), e dicroísmo circular (aparelho CD Jasco® J-810).

Foi observado o efeito das substâncias isoladas em *Trichophyton rubrum* LMGO 4218 por meio de um microscópio de epifluorescência Zeiss® Axio lab. A1, usando o corante calcofluor white (Escalante *et al.*, 2008).

Estudos de associação das substâncias isoladas com o ergosterol foram conduzidos de acordo com trabalhos de (Meletiadis *et al.*, 2010), a fim de observar eventual atividade sinérgica. Estes testes de interação com o ergosterol permitiram avaliar possíveis mecanismos de ação das substâncias (Escalante *et al.*, 2008).

A medida da concentração fungicida mínima permitiu conhecer a concentração capaz de matar totalmente os fungos patogênicos humanos (Majoros e Kardos, 2008).

Foram selecionadas 15 espécies de árvores especializadas na formação de madeira imputrescível: *Balizia pedicellaris* (DC) Barneby & J.W. Grimes (Leguminosae – Mimosoideae), *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber (Moraceae), *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) Benth. (Leguminosae – Mimosoideae), *Erismia uncinatum* Warm. (Vochysiaceae), *Glycydendron amazonicum* Ducke (Euphorbiaceae), *Humiria balsamifera* (Aubl.) St.-Hil. (Humiriaceae), *Hymenolobium flavum* Kleinhoonte (Leguminosae – Papilionoideae), *Inga alba* (S.w) Willd. (Leguminosae – Mimosoideae), *Lecythis idatimon* A. DC. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Licaria guianensis* Aubl. (Lauraceae), *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev. (Sapotaceae), *Micropholis guyanensis* (A. DC) Pierre (Sapotaceae), *Peltogyne* sp. Vogel (Leguminosae – Caesalpinioideae), *Spirotropis longifolia* (DC) Baill. (Leguminosae – Papilionoideae), *Unonopsis rufescens* (Baill.) R.E. Fr. (Annonaceae) e *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & J.W. Grimes (Mimosoideae).

Foram produzidos 60 extratos acetato de etila e metanol provenientes de vários órgãos destas plantas. A atividade dos extratos foi avaliada e por meio do teste de perfuração em ágar em *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 1931, e por meio do teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2008a, b) em *Trichophyton rubrum* LMGO 4218 e *Candida albicans* ATCC 10231 (Tabela 1).

Tabela 1 Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg/mL) dos extratos em *Trichophyton rubrum* LMGO 4218 e *Candida albicans* ATCC 10231; e diâmetros de inibição (mm) dos extratos em *T. mentagrophytes* LMGO 1931

Espécie	Órgão vegetal	<i>T. rubrum</i> LMGO 4218		<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>T. mentagrophytes</i> LMGO 1931	
		CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)		Diâmetro de inibição (mm)	
		AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
<i>Balizia pedicellaris</i>	Madeira	-	-	-	-	15	13
	Casca do caule	-	-	-	-	15	-
<i>Brosimum guianense</i>	Casca do caule	-	-	-	-	-	-
<i>Enterolobium schomburgkii</i>	Madeira	-	-	-	-	13	-
	Casca do caule	-	31,25	-	7,8	21	18
<i>Erisma uncinatum</i>	Madeira	-	-	-	-	-	-
	Casca do caule	-	-	-	-	11	-
<i>Glycydendron amazonicum</i>	Madeira	-	-	31,25	-	-	-
	Casca do caule	-	-	-	-	25	-
<i>Humiria balsamifera</i>	Madeira	31,25	31,25	31,25	31,25	21	14
	Casca do caule	31,25	15,6	31,25	7,8	25	17
	Galhos	31,25	31,25	-	62,5	21	20
<i>Hymenolobium flavum</i>	Madeira	62,5	-	-	-	-	30
	Casca do caule	31,25	62,5	62,5	-	-	25
<i>Inga alba</i>	Madeira	-	-	-	-	20	-
	Casca do caule	-	-	-	-	-	-
<i>Lecythis idatimon</i>	Madeira	31,25	15,6	62,5	31,25	10	-
<i>Licaria guianensis</i>	Cerne	-	62,5	-	31,25	-	-
	Alburno	-	62,5	-	62,5	11	-
	Casca do caule	-	125	-	-	10	25
<i>Manilkara huberi</i>	Madeira	-	62,5	-	31,25	-	12
	Casca do caule	-	62,5	-	31,25	-	-
<i>Micropholis guyanensis</i>	Casca do caule	-	125	-	15,6	-	16
<i>Peltogyne</i> sp.	Madeira	62,5	-	31,35	-	-	-
<i>Spirotropis longifolia</i>	Madeira	31,25	62,5	62,5	15,6	-	-
	Casca do caule	-	-	-	-	-	16
	Raízes	125	-	62,5	-	-	12
	Raízes adventícias	15,6	125	31,25	62,5	27	-

<i>Unonopsis rufescens</i>	Madeira	-	-	125	-	11	-
	Casca do caule	-	-	62,5	-	10	35
<i>Zygia racemosa</i>	Madeira	-	31,25	-	-	-	28
	Casca do caule	-	125	-	-	15	13
Itraconazol			4		0,5		10
Fluconazol			8		1		20

- : Inativo (CIM > 125 µg/mL)

Os resultados obtidos mostraram que 10 extratos, correspondendo a 45% do total apresentaram atividade em pelo menos um fungo – *T. rubrum* LMGO 4218 e/ou *C. albicans* ATCC 10231, com valores de CIM \leq 62,5 µg/mL. A alta taxa de atividade antifúngica deixa supor que a seleção de espécies possuidoras de madeira resistente à degradação permitiu orientar a triagem de uma forma positiva. Em outros termos, a bio-inspiração é uma ferramenta útil permitindo realizar triagens não-aleatórias, com escolha de espécies que possibilitam a produção de extratos com maior atividade antifúngica.

Os dez extratos ativos (CIM \leq 62,5 µg/mL) foram testados em outros dermatófitos: *Microsporum gypseum* LMGO 533, *Microsporum canis* LMGO 02 e *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 1931; e outras leveduras: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* LMGO 44, *Candida krusei* LMGO 174 e *Cryptococcus neoformans* LMGO 02; e em fungos xilófagos: *Pycnoporus sanguineus* e *Coriolus versicolor*. A realização desses ensaios permitiu observar o espectro de ação dos extratos, a fim de selecionar com maior rigor os extratos ativos. Os resultados desses testes estão na tabela 2.

Tabela 2 Atividade dos extratos (CIM - µg/mL) em *Microsporium gypseum* LMGO 533, *Microsporium canis* LMGO 02, *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 1931, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* LMGO 44, *Candida krusei* LMGO 174, *Cryptococcus neoformans* LMGO 02

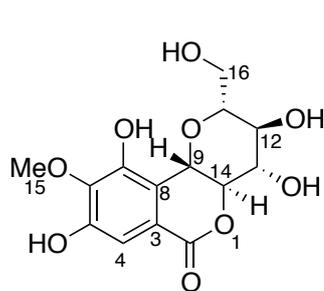
Espécie	Órgão vegetal	Solvente	Dermatófitos			Leveduras				Xilófagos	
			<i>M. g</i> LMGO 533	<i>M. c</i> LMGO 02	<i>T. m</i> LMGO 1931	<i>C. p</i> ATCC 22019	<i>C. g</i> LMGO 44	<i>C. k</i> LMGO 174	<i>C. n</i> LMGO 02	<i>Pycnoporus</i> <i>sanguineus</i>	<i>Coriolus</i> <i>versicolor</i>
<i>Humiria</i>	Madeira	MeOH	31,25	125	-	3,9	31,25	7,8	31,25	31,25	15,6
<i>balsamifera</i>	Madeira	AcOEt	31,25	-	125	7,8	62,5	15,6	31,25	31,25	62,5
<i>Licaria</i>	Madeira	MeOH	31,25	15,6	31,25	7,8	62,5	7,8	62,5	62,5	7,8
<i>guianensis</i>											
<i>Manilkara</i>	Madeira	MeOH	125	-	-	-	-	-	-	125	31,25
<i>huberi</i>											
<i>Peltogyne</i> sp.	Madeira	AcOEt	-	62,5	125,0	125,0	7,8	62,5	62,5	125,0	62,5
<i>Spirotropis</i>	Madeira	MeOH	62,5	62,5	-	-	-	7,8	-	31,25	62,5
<i>longifolia</i>	Raízes	AcOEt	125	-	-	-	-	7,8	-	-	31,25
	Raízes	MeOH	-	-	-	-	-	62,5	-	-	31,25
	adventícias										
	Raízes	AcOEt	31,25	62,5	62,5	62,5	125	7,8	62,5	7,8	31,25
	adventícias										
<i>Zygia</i>	Madeira	MeOH	62,5	-	62,5	-	62,5	62,5	62,5	62,5	31,25
<i>racemosa</i>											
Itraconazol (16 µg/mL)			0,5	4	0,5	0,25	1	2	1	1	0,5

-: inativo (CIM > 125 µg/mL), *M.g*: *Microsporium gypseum*, *M.c*: *Microsporium canis*, *T.m*: *Trichophyton mentagrophytes*, *C.p*: *Candida parapsilosis*, *C.g*: *Candida glabrata*, *C.k*: *Candida krusei*, *C. n*: *Cryptococcus neoformans*

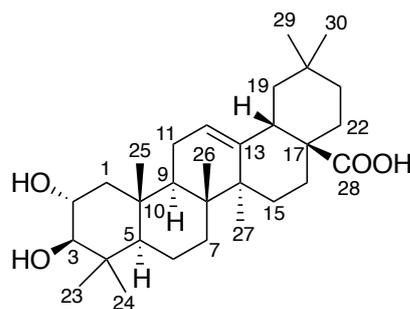
Nessa seleção, cinco extratos se destacaram por apresentar boa atividade em todos os fungos analisados. Observa-se que, em geral os dermatófitos são mais resistentes do que às leveduras; e nota-se ainda uma correlação entre a atividade em fungos xilófagos e fungos humanos. Essa correlação permite concluir sobre a validação da segunda consideração feita nesse trabalho, ou seja, que se um extrato for ativo em fungos xilófagos, este poderia ser ativo em fungos patogênicos humanos. Os extratos selecionados para conduzir um isolamento biomonitorado das substâncias responsáveis pela atividade antifúngica foram os seguintes:

- extrato acetato de etila da madeira de *Humiria balsamifera*
- extratos acetato de etila das raízes e das raízes adventícias de *Spirotropis longifolia*
- extrato acetato de etila da madeira de *Peltogyne* sp.
- extrato acetato de etila da madeira de *Unonopsis rufescens*

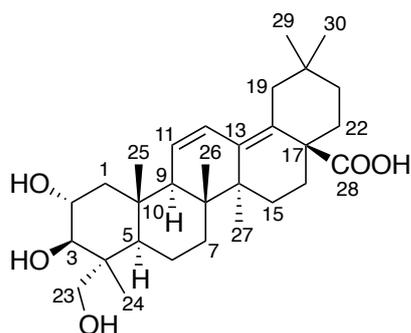
A partir do fracionamento do extrato acetato de etila de *Humiria balsamifera* foram obtidas quatro substâncias, sendo três triterpenos: ácido arjunólico, ácido maslínico e ácido dehidroarjunólico; e uma isocoumarina, a bergenina (figura 1). Dentre essas, a bergenina mostrou atividade diferenciada em levedura com valor de CIM entre 4 e 8 µg/mL. A bergenina não foi tóxica para as células MRC5 e MDA-MB-435 ($IC_{50} > 128$ µg/mL), enquanto os triterpenos não apresentaram atividade na linhagem KB.



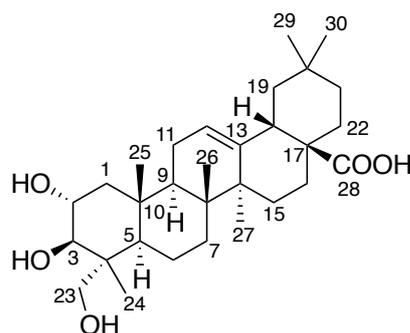
HB-1 : Bergenina



HB-2 : Ácido maslínico



HB-3 : Ácido dehidroarjunólico



HB-4 : Ácido arjunólico

Figura 1 Substâncias isoladas do extrato acetato de etila da madeira de *Humiria balsamifera*

Os derivados da família dos galotaninos, como a bergenina são caracterizados por um esqueleto tricíclico possuidor de uma unidade osídica. A bergenina e seus derivados são produtos isolados de várias espécies de plantas, como a *Bergenina purpurasens* (Xin-Min *et al.*, 1987), *Mallitus japonicus* (Yoshida *et al.*, 1982) e *Marcaranga peltata* (Ramaiah *et al.*, 1979). Estes constituem os princípios ativos de plantas usadas na medicina tradicional indiana como antitussígenas (Xin-Min *et al.*, 1987), anti-úlceras (Yoshida *et al.*, 1982), antioxidante (De Abreu *et al.*, 2008), e para o tratamento de doenças venéreas (Ramaiah *et al.*, 1979). Eles possuem também atividades *in vitro* sobre o vírus HIV (Piacente *et al.*, 1996). A bergenina foi relatada como ativa em espécies de *Candida*, com valores de CIM variando entre 4,9 e 9,8 µg/mL (Da Silva *et al.*, 2009).

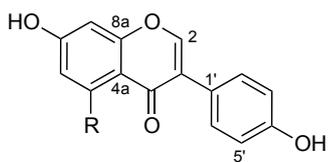
É comum a presença do ácido maslínico nos vegetais superiores. Este composto foi descrito por sua atividade em fungo fitopatogênico (El Lahlou *et al.*, 1999) e como sendo uma fitoalexina. Descrito por suas propriedades antitumorais (Li *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2006; Reyes-Zurita *et al.*, 2009), e pela atividade antioxidante (Sultana e Nam, 2007; Wang *et al.*, 2006b), anti-vírus HIV (Parra *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 1996), inibidor da enzima glicogênio fosforilase (Wen *et al.*, 2006), ou ainda pela citotoxicidade (Wang *et al.*, 2006a), que gera controvérsias (Numata *et al.*, 1989). A

propriedade anti-inflamatória (Aladedunye *et al.*, 2008; Banno *et al.*, 2005) foi patenteada para uma pomada (Kuno e Shinohara, 2003).

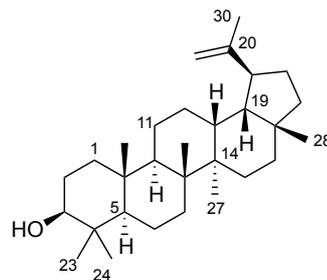
O ácido dehidroarjunólico foi isolado pela primeira vez de *Terminalia tomentosa* (Combretaceae) (Ramachandra Row e Subba Rao, 1962) e nenhuma atividade biológica foi descrita.

O ácido arjunólico é provavelmente mais comum nos vegetais que o ácido maslínico, e já foi isolado de várias espécies. Esse composto é descrito pela atividade em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans* com CIM de 50 µg/mL (Bisoli *et al.*, 2008); e pela atividade anti-inflamatória e anticolinesterase (Facundo *et al.*, 2005).

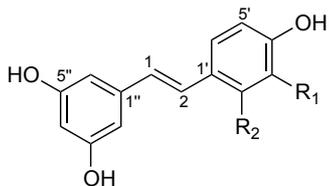
A partir do fracionamento do extrato acetato de etila das raízes e das raízes adventícias de *Spirotropis longifolia* foram obtidas e identificadas 14 substâncias, dentre essas, vários pterocarpanos, isoflavonas, estilbenos e um fitosterol. Quatro das substâncias ainda não haviam sido reportadas na literatura e foram nomeadas spirotropina A, B e C e a spirotropona (Figura 2). E três outras substâncias ainda não haviam sido reportadas na família Leguminosae; além de outras, cuja atividade antifúngica ainda não era descrita na literatura. As substâncias novas para a família das Leguminosae - gnetina E, gnetina D e o latifolol, mostraram atividade em cepas de *Candida* spp e dermatófitos com valores de CIM entre 2 e 16 µg/mL. O piceatanol, um estilbeno comum nas Leguminosae, mostrou atividade diferenciada com valor de CIM entre 1 e 16 µg/mL. Das quatro substâncias pertencentes à classe dos polifenóis, o piceatanol é o que apresentou o melhor índice de seletividade com valores entre 100 e 13, quando considerado IC₅₀ em MDA-MB-435 e MRC5 / CIM em leveduras do gênero *Candida*. As substâncias inéditas não foram ativas em fungos e em células KB.



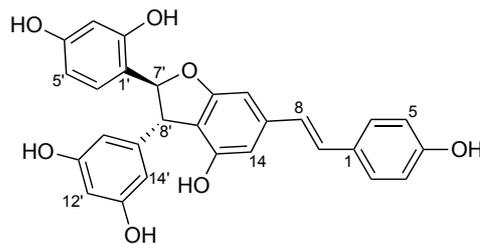
SP-1 R = H : Daidzeina
SP-2 R = OH : Genisteina
SP-3 R = OMe : Isopruneitina



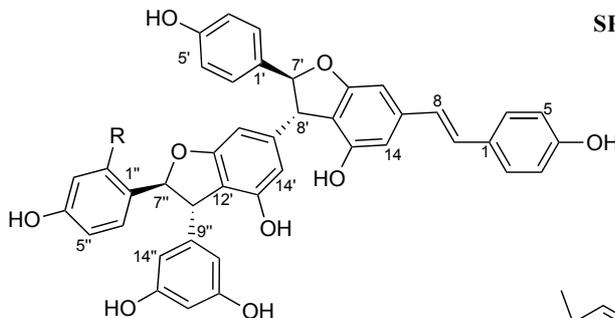
SP-4 : Lupeol



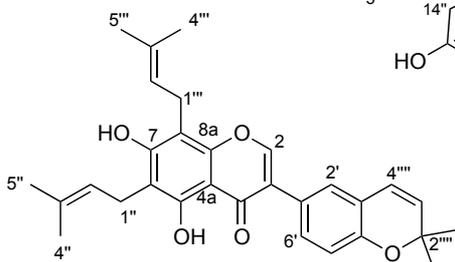
SP-5 R₁ = OH ; R₂ = H : Piceatanol
SP-6 R₁ = R₂ = H : *trans*-Resveratrol
SP-10 R₁ = H ; R₂ = OH : *trans*-Oxyresveratrol



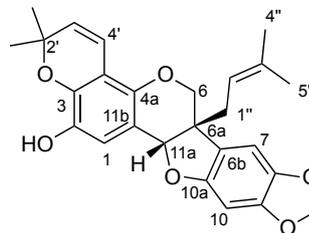
SP-7 : Gnetina D



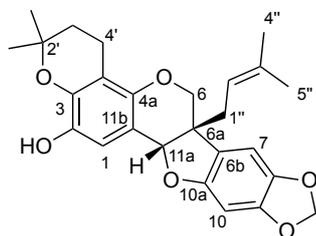
SP-8 R = H : Gnetina E
SP-9 R = OH : Latifolol



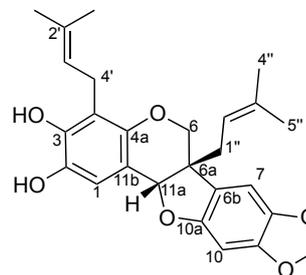
SP-11 : Spirotropona



SP-12 : Spirotropina A



SP-13 : Spirotropina B



SP-14 : Spirotropina C

Figura 2 Substâncias isoladas de *Spirotropis longifolia*:

As isoflavonas daidzeina, genisteina e isopruneitina já foram isoladas de vários vegetais (Reinwald e Weaver, 2006). As atividades biológicas mais marcantes são as propriedades protetoras

contra o câncer (Virk-Baker *et al.*, 2010), a capacidade antioxidante (Pietta, 2000) e como fitoestrógeno (Halabalaki *et al.*, 2006).

O triterpeno lupeol também é um composto muito comum nas plantas. Este possui várias propriedades biológicas descritas, sendo as mais notáveis as atividades em células de câncer (Laszczyk, 2009), e as antifúngicas (Shai *et al.*, 2008).

Os três estilbenos - piceatanol, *trans* resveratrol e *trans* oxyresveratrol são bem estudados. Eles são conhecidos como fitoalexinas antifúngicas (Brinker e Seigler, 1991), ou ainda pelas propriedades anti-leucêmicas (Ferrigni *et al.*, 1984; Mannila *et al.*, 1993), antioxidantes (Rüweler *et al.*, 2009) e inibidoras das proteínas quinases (Geahlen e McLaughlin, 1989).

Os oligostilbenos - gnetina D, gnetina E e latifolol são polímeros do resveratrol encontrados no gênero *Gnetum* spp (Gnetaceae) (Ali *et al.*, 2003; Boralle *et al.*, 1993; Iliya *et al.*, 2002a; Iliya *et al.*, 2001; Iliya *et al.*, 2002b; Iliya *et al.*, 2002c; Lins *et al.*, 1982), e em *Cyphostemma* spp (Vitaceae) (Bala *et al.*, 2000). Esses compostos são bastante raros e nunca foram isolados da família Leguminosae. Sendo polifenóis, é provável que eles possuam atividade antioxidante (Ha *et al.*, 2009), e que a gnetina D tenha propriedades antigripais (Liu *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a gnetina E possui atividade em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* com CIM de 4 a 8 µg/mL (Nitta *et al.*, 2002).

A spirotropona (**SP-11**) é um isoflavonóide prenilado, geralmente de distribuição limitada a alguns gêneros da família Leguminosae (Lapčík, 2007). Os isoflavonóides prenilados compõem o grupo das fitoalexinas, às vezes possuidores de propriedades antifúngicas (Barron e Ibrahim, 1996). Da mesma forma, os pterocarpanos prenilados que foram isolados - spirotropina A (**SP-12**), spirotropina B (**SP-13**) e spirotropina C (**SP-14**) também podem ser fitoalexinas e possuir propriedades biológicas semelhantes.

Do extrato acetato de etila da madeira do caule de *Unonopsis rufescens* foi possível isolar e identificar a ursulina (Figura 3). Essa substância não apresentou atividade antifúngica, nem atividade citotóxica.

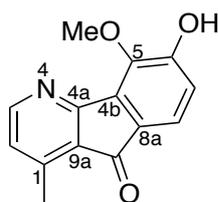


Figura 3 Estrutura da ursulina (UR-1) isolada de *Unonopsis rufescens*

A ursulina foi isolada pela primeira vez de *Unonopsis spectabilis* (Laprévote *et al.*, 1988), e em seguida de outras Annonaceae do gênero *Guatteria* sp (Berthou *et al.*, 1989; Cortes *et al.*, 1986; Cortes *et al.*, 1985) e *Polyalthia* sp (Lavault *et al.*, 1990). Não existem relatos de atividade biológica descritos para a ursulina.

A partir do fracionamento do extrato acetato de etila da madeira do caule de *Peltogyne* sp foram obtidas 2 substâncias, o mopanol e o peltogynol (figura 4). O mopanol mostrou excelente atividade antifúngica em leveduras com valores de CIM entre 0,5 e 2 µg/mL, porém apresentou pronunciada toxicidade em célula humana.

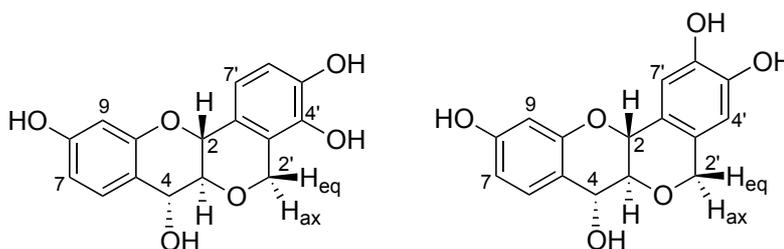


Figura 4 Compostos isolados do extrato acetato de etila da madeira de *Peltogyne* sp.:
(+)-mopanol (esquerda) e (+)-peltogynol (direita)

O (+)-mopanol e o (+)-peltogynol já tinham sido isolados de espécies do gênero *Peltogyne* spp. (De Almeida *et al.*, 1974; Malan e Roux, 1974). Essas moléculas estruturalmente próximas são encontradas em *Colophospermum mopane* (Leguminosae - Caesalpinioideae) (Ferreira *et al.*, 2003) e *Lysidice rhodostegia* (Leguminosae - Caesalpinioideae) (Gao *et al.*, 2004). As atividades biológicas são pouco conhecidas, no entanto, (+)-mopanol é descrito pelas propriedades vasodilatadoras (Gao *et al.*, 2004).

Estudos microbiológicos foram feitos a fim de avaliar o comportamento dos fungos em presença das substâncias isoladas. Foi realizado um estudo por microscopia com o ácido maslínico (**HB-2**) e

gnetina E (**SP-8**) em células de *T. rubrum* LMGO 4218; e um estudo de sinergia da bergenina (**HB-1**) associada com fluconazol, por meio do teste FIC (*Fractional Inhibitory Concentration*, Concentração inibitória fracionária). E ainda, um teste de interação da gnetina E, bergenina e piceatanol com o ergosterol da membrana fúngica, além da avaliação da ação fungicida.

Não foi possível determinar com certeza os mecanismos de ação destas substâncias antifúngicas isoladas. Porém, foram esclarecidos alguns pontos interessantes do comportamento da gnetina E, bergenina e ácido maslínico em células fúngicas.

A gnetina E e o ácido maslínico parecem interagir com a parede ou a membrana de *T. rubrum* causando alteração da morfologia celular. Essas modificações celulares talvez se devam à fluidificação da membrana, causando permeabilidade da célula. Esses efeitos morfológicos conduziriam à diminuição do crescimento celular, com modificação da estrutura da rede de hifas, podendo levar a morte da célula fúngica.

Essas interações parecem ocorrer também no caso da bergenina, facilitando a penetração do fluconazol na célula. Nesse caso, a bergenina e o fluconazol agiriam em sinergia, principalmente para leveduras resistentes, permitindo aumentar a eficiência do fluconazol por mil vezes.

Conclui-se com esse trabalho que a seleção bio-inspirada de espécies especializadas na formação de madeira resistente à degradação fúngica, permitiu escolher as árvores promissoras dentro das inúmeras da Amazônia. E que foi possível demonstrar a relação entre durabilidade natural da madeira e capacidade antifúngica dos extratos e substâncias presentes nessa madeira.

A partir das quatro espécies submetidas ao fracionamento bio-monitorado: *Humiria balsamifera*, *Peltogyne* sp., *Spirotropis longifolia* e *Unonopsis rufescens* foi possível isolar e caracterizar 21 substâncias, sendo que quatro delas ainda não haviam sido reportadas na literatura - spirotropina A, spirotropina B e spirotropina C e spirotropona; três ainda não haviam sido descritas para a família das Leguminosae - gnetina E, gnetina D e latifolol; e seis outras - ácido maslínico, bergenina, mopanol, piceatanol, gnetina E e gnetina D - com boa atividade antifúngica.

Estudos microbiológicos preliminares e uma avaliação da citotoxicidade dessas substâncias permitiram sugerir modos de ação. De uma maneira geral, todas elas parecem agir por alteração do citoesqueleto da célula fúngica e animal, sendo assim inadequadas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Todavia, a bergenina, isolada de *Humiria balsamifera* em associação com o fluconazol mostrou bom potencial para o desenvolvimento de um tratamento antifúngico. E o

piceatanol, isolado de *Spirotropis longifolia* é uma substância diferenciada por ter apresentado boa atividade antifúngica em leveduras e baixa toxicidade em células humanas.

Contudo, vários outros estudos são necessários para refinar nossas conclusões. O fluconazol é utilizado em terapia *per os* para o tratamento de candidíases invasivas (Mathew e Nath, 2009), e a bergenina e o piceatanol apresentam fraca biodisponibilidade (Asensi *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2010). Seria necessário associar essas duas substâncias aos imidazóis, tais como o clotrimazol, miconazol, econazol ou cetoconazol; e ainda às alilaminas, como a terbinafina (Hay, 2009), que são medicamentos usados para o tratamento tópico das candidíases muco-cutâneas.

BIBLIOGRAFIA

Afnor, 1994a. Norme NF EN 350-1: Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois. Durabilité naturelle du bois massif. Partie 1: Guide des principes d'essai et de classification de la durabilité naturelle du bois.

Afnor, 1994b. Norme NF EN 350-2 : Durabilité du bois et des matériaux dérivés du bois. Durabilité naturelle du bois massif. Partie 2 : Guide de la durabilité naturelle du bois et de l'imprégnabilité d'essences de bois choisies pour leur importance en Europe.

Afnor, 1996. Norme NF EN 113: Produits de préservation du bois. Méthode D'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores.

Aladedunye, F. A., Okorie, D. A., Ighodaro, O. M., 2008. Anti-inflammatory and antioxidant activities and constituents of *Platostoma africanum* P. Beauv. Natural Product Research 22, 1067-1073.

Ali, Z., Tanaka, T., Iliya, I., Inuma, M., Furusawa, M., Ito, T., Nakaya, K. I., Murata, J., Darnaedi, D., 2003. Phenolic constituents of *Gnetum klossii*. Journal of Natural Products 66, 558-560.

Aly, R., 1994. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. Journal of the American Academy of Dermatology 31, S21-S25.

Amusant, N., Moretti, C., Richard, B., Prost, E., Nuzillard, J. M., Thévenon, M. F., 2007. Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). Holz als Roh - und Werkstoff 65, 23-28.

Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M. C., Obrador, E., Estrela, J. M., 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. Free Radical Biology and Medicine 33, 387-398.

Bala, A. E. A., Kollmann, A., Ducrot, P. H., Majira, A., Kerhoas, L., Leroux, P., Delorme, R., Einhorn, J., 2000. *Cis* viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. Journal of Phytopathology 148, 29-32.

Baldo, A., Monod, M., Mathy, A., Cambier, L., Bagut, E. T., Defaweux, V., Symoens, F., Antoine, N., Mignon, B., 2011. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*.

Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., Nishino, H., 2005. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1995-1999.

Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C., 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56, 17.

Barron, D., Ibrahim, R. K., 1996. Isoprenylated flavonoids - A survey. *Phytochemistry* 43, 921-982.

Bednarek, P., Osbourn, A., 2009. Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746-748.

Berthou, S., Lebœuf, M., Cavé, A., Guinaudeau, H., 1989. Alcaloides des annonacées, 89: Bisbenzylisoquinoléines de *Guatteria guianensis*. *Journal of Natural Products* 52, 95-98.

Bisoli, E., Garcez, W. S., Hamerski, L., Tieppo, C., Garcez, F. R., 2008. Bioactive Pentacyclic Triterpenes from the Stems of *Combretum laxum*. *Molecules* 13, 2717-2728.

Blair, J. E., 2007. State-of-the-art treatment of coccidioidomycosis: Skin and soft-tissue infections. vol. 1111, pp. 411-421.

Boralle, N., Gottlieb, H. E., Gottlieb, O. R., Kubitzki, K., Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Young, M. C. M., 1993. Oligostilbenoids from *Gnetum venosum*. *Phytochemistry* 34, 1403-1407.

Brinker, A. M., Seigler, D. S., 1991. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Phytochemistry* 30, 3229-3232.

Carneiro, J. S., Emmert, L., Sternadt, G. H., Mendes, J. C., Almeida, G. F., 2009. Decay susceptibility of Amazon wood species from Brazil against white rot and brown rot decay fungi. *Holzforschung* 63, 767-772.

Chakrabarti, A., Singh, R., 2011. The emerging epidemiology of mould infections in developing countries. *Current Opinion in Infectious Diseases* 24, 521-526.

CLSI, 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd edn. Document M38-A2.

CLSI, 2008b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 2nd edn. Document M27-A3.

Colombo, A. L., Tobn, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., Nucci, M., 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology* 49, 785-798.

Cortes, D., Hocquemiller, R., Leboeuf, M., Cavé, A., Moretti, C., 1986. Alcaloïdes des annonacées, 68: Alcaloïdes des feuilles de *Guatteria ouregou*. *Journal of Natural Products* 49, 878-884.

Cortes, D., Ramahatra, A., Cavé, A., De Carvalho Bayma, J., Dadoun, H., 1985. Alcaloïdes des annonacees, LVIII. Alcaloïdes des écorces de *Guatteria schomburgkiana*. *Journal of Natural Products* 48, 254-259.

Croteau, R., Kutchan, T. M., Norman, G. L., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* 24, 68.

Da Silva, J. M. C., Rylands, A. B., Da Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology* 19, 689-694.

Da Silva, S. L., de Oliveira, V. G., Yano, T., Nunomura, R. C. S., 2009. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. *Acta Amazonica* 39, 187-192.

De Abreu, H. A., Aparecida Dos S. Lago, I., Souza, G. P., Pila-Veloso, D., Duarte, H. A., Alcantara, A. F. D. C., 2008. Antioxidant activity of (+)-bergenin - a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). *Organic and Biomolecular Chemistry* 6, 2713-2718.

De Almeida, M. E., Gottlieb, O. R., RÄngo de sousa, J., Teixeira, M. A., 1974. New peltogynoids from three Peltogyne species. *Phytochemistry* 13, 1225-1228.

Dhillon, R. H., Clark, J., 2011. Fungal infections in the critically ill. *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 1, 210-218.

El Lahlou, H., Hirai, N., Tsuda, M., Ohigashi, H., 1999. Triterpene phytoalexins from nectarine fruits. *Phytochemistry* 52, 623-629.

Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., Zacchino, S., 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products* 71, 1720-1725.

Facundo, V. A., Riosa, K. A., Medeiros, C. M., Militãoa, J. S. L. T., Miranda, A. L. P., Epifanio, R. D. A., Carvalho, M. P., Andrade, A. T., Pinto, A. C., Rezende, C. M., 2005. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: Anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16, 1309-1312+S1301.

Ferreira, D., Marais, J. P. J., Slade, D., 2003. Phytochemistry of the mopane, *Colophospermum mopane*. *Phytochemistry* 64, 31-51.

Ferrigni, N. R., McLaughlin, J. L., Powell, R. G., Smith Jr, C. R., 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *Journal of Natural Products* 47, 347-352.

Gao, S., Feng, N., Yu, S., Yu, D., Wang, X., 2004. Vasodilator constituents from the roots of *Lysidice rhodostega*. *Planta Medica* 70, 1128-1134.

Geahlen, R. L., McLaughlin, J. L., 1989. Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165, 241-245.

Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J., 1996. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 279-291.

Granato, D., Nunes, D. S., De Mattos, P. P., De Moura Rios, E., Glinski, A., Rodrigues, L. C., Zanusso Jr, G., 2005. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 237-241.

Grayer, R. J., Kokubun, T., 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56, 253-263.

Ha, D. T., Kim, H., Thuong, P. T., Ngoc, T. M., Lee, I., Hung, N. D., Bae, K., 2009. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity of oligostilbenes from the leaf and stem of *Vitis amurensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 304-309.

Halabalaki, M., Alexi, X., Aligiannis, N., Lambrinidis, G., Pratsinis, H., Florentin, I., Mitakou, S., Mikros, E., Skaltsounis, A. L., Alexis, M. N., 2006. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. *Planta Medica* 72, 488-493.

Hawksworth, D. L., 2006. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95, 14.

Hay, R., 2009. Superficial fungal infections. *Medicine* 37, 610-612.

Hernday, A. D., Noble, S. M., Mitrovich, Q. M., Johnson, A. D., 2010. Genetics and molecular biology in *Candida albicans*. vol. 470, pp. 737-758.

Iliya, I., Ali, Z., Tanaka, T., Iinuma, M., Furusawa, M., Nakaya, K. I., Murata, J., Darnaedi, D., 2002a. Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (Gnetaceae). *Phytochemistry* 61, 959-961.

Iliya, I., Tanaka, T., Furusawa, M., Ali, Z., Nakaya, K. I., Iinuma, M., Shirataki, Y., Murata, J., Darnaedi, D., 2001. Four new glucosides of stilbene oligomers from the stem of *Gnetum gnemonoides*. *Heterocycles* 55, 2123-2130.

Iliya, I., Tanaka, T., Iinuma, M., Ali, Z., Furusawa, M., Nakaya, K.-i., 2002b. Dimeric stilbenes from stem lianas of *Gnetum Africanum*. *Heterocycles* 57, 1057-1062.

Iliya, I., Tanaka, T., Iinuma, M., Ali, Z., Furusawa, M., Nakaya, K. I., Shirataki, Y., Murata, J., Darnaedi, D., 2002c. Stilbene derivatives from two species of Gnetaceae. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 796-801.

Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simporé, J., Colizzi, V., Traore, A. S., 2006. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology* 5, 195-200.

Kullberg, B. J., Verweij, P. E., Akova, M., Arendrup, M. C., Bille, J., Calandra, T., Cuenca-Estrella, M., Herbrecht, R., Jacobs, F., Kalin, M., Kibbler, C. C., Lortholary, O., Martino, P., Meis, J. F., Munoz, P., Odds, F. C., De Pauw, B. E., Rex, J. H., Roilides, E., Rogers, T. R., Ruhnke, M., Ullmann, A. J., Uzun, ñ., Vandewoude, K., Vincent, J. L., Donnelly, J. P., 2011. European expert opinion on the management of invasive candidiasis in adults. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 1-12.

Kuno, N., Shinohara, G., 2003. External Agent for the skin and Whitening Agent.

Lapčik, O., 2007. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* 68, 2909-2916.

Laprévôte, O., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., 1988. Alcaloïdes des annonacées, 87. Azafluorènones de l'*Unonopsis spectabilis*. *Journal of Natural Products* 51, 555-561.

Laszczyk, M. N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica* 75, 1549-1560.

Lavault, M., Guinaudeau, H., Bruneton, J., Sevenet, T., Hadi, H. A., 1990. (-)-Thaipetaline, a tetrahydroprotoberberine from a *Malayan annonaceae*. *Phytochemistry* 29, 3845-3847.

Li, C., Yang, Z., Zhai, C., Qiu, W., Li, D., Yi, Z., Wang, L., Tang, J., Qian, M., Luo, J., Liu, M., 2010. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF-KB signaling pathway. *Molecular Cancer*, 73.

Lins, A. P., Ribeiro, M. N. D. S., Gottlieb, O. R., Gottlieb, H. E., 1982. Gnetins: Resveratrol oligomers from *Gnetum species*. *Journal of Natural Products* 45, 754-761.

Liu, A. L., Yang, F., Zhu, M., Zhou, D., Lin, M., Lee, S. M. Y., Wang, Y. T., Du, G. H., 2010. In vitro anti-influenza viral activities of stilbenoids from the lianas of *Gnetum pendulum*. *Planta Medica* 76, 1874-1876.

Lupi, O., Tyring, S. K., McGinnis, M. R., 2005. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 931-954.

Malan, E., Roux, D. G., 1974. (+)-2,3-*trans*-pubeschin, the first catechin analogue of peltogynoids from *Peltogyne pubescens* and *P. venosa*. *Phytochemistry* 13, 1575-1579.

Mannila, E., Talvitie, A., Kolehmainen, E., 1993. Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry* 33, 813-816.

Martinez-Rossi, N. M., Peres, N. T. A., Rossi, A., 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 166, 369-383.

Mathew, B. P., Nath, M., 2009. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem* 4, 310-323.

Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E., Walsh, T. J., 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro* - *in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 602-609.

Nemli, G., Gezer, E. D., Yildiz, S., Temiz, A., Aydin, A., 2006. Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from particles impregnated with *Pinus brutia* bark extractives. *Bioresource Technology* 97, 2059-2064.

Nitta, T., Arai, T., Takamatsu, H., Inatomi, Y., Murata, H., Inuma, M., Tanaka, T., Ito, T., Asai, F., Ibrahim, I., Nakanishi, T., Watabe, K., 2002. Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Health Science* 48, 273-276.

Numata, A., Yang, P., Takahashi, C., Fujiki, R., Nabaie, M., Fujita, E., 1989. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 648-651.

Parra, A., Rivas, F., Lopez, P. E., Garcia-Granados, A., Martinez, A., Albericio, F., Marquez, N., Muñoz, E., 2009. Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 1139-1145.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 133-163.

Pfaller, M. A., Sutton, D. A., 2006. Review of *in vitro* activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56, 147-152.

Piacente, S., Pizza, C., De Tommasi, N., Mahmood, N., 1996. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity. *Journal of Natural Products* 59, 565-569.

Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042.

Powers, J. H., 2004. Considerations in clinical trials of combination antifungal therapy. *Clinical Infectious Diseases* 39, S228-S235.

Qin, X., Yang, Y., Fan, T. T., Gong, T., Zhang, X. N., Huang, Y., 2010. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergenin-phospholipid complex. *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 127-136.

Ramachandra Row, L., Subba Rao, G. S. R., 1962. Chemistry of *Terminalia* species-VI. The constitution of tomentosic acid, a new triterpene carboxylic acid from *Terminalia tomentosa* wight et arn. *Tetrahedron* 18, 827-838.

Ramaiah, P. A., Row, L. R., Reddy, D. S., Anjaneyulu, A. S. R., Ward, R. S., Pelter, A., 1979. Isolation and characterisation of bergenin derivatives from *Macaranga peltata*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1, 2313-2316.

Reinwald, S., Weaver, C. M., 2006. Soy isoflavones and bone health: A double-edged sword? *Journal of Natural Products* 69, 450-459.

Reyes, F. J., Centelles, J. J., Lupianez, J. A., Cascante, M., 2006. (2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Letters* 580, 6302-6310.

Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., Lupiñez, J. A., Cascante, M., 2009. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Letters* 273, 44-54.

Rodrigues, A. M. S., Theodoro, P. N. E. T., Eparvier, V., Basset, C., Silva, M. R. R., Beauchêne, J., Espíndola, L. S., Stien, D., 2010. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. *Journal of Natural Products* 73, 1706-1707.

Rüweler, M., Gulden, M., Maser, E., Murias, M., Seibert, H., 2009. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astrogloma cells in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 182, 128-135.

Scheffer, T. C., Morrell, J. J., 1998. Natural durability of wood: A worldwide checklist of species. Forest Research Laboratory Research Contribution 22, 58.

Schultz, T. P., Nicholas, D. D., 2000. Naturally durable heartwood: Evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54, 47-52.

Shai, L. J., McGaw, L. J., Aderogba, M. A., Mdee, L. K., Eloff, J. N., 2008. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 238-244.

Sultana, N., Nam, H. L., 2007. Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytotherapy Research* 21, 1171-1176.

Sunenshine, P. J., Schwartz, R. A., Janniger, C. K., 1998. *Tinea versicolor*. *International Journal of Dermatology* 37, 648-655.

Szepietowski, J. C., Baran, E., Wild, E., 2000. *Tinea versicolor*: A prospective study. *Korean J Med Mycol* 5, 108-112.

Taylor, A. M., Gartner, B. L., Morrell, J. J., Tsunoda, K., 2006. Effects of heartwood extractive fractions of *Thuja plicata* and *Chamaecyparis nootkatensis* on wood degradation by termites or fungi. *Journal of Wood Science* 52, 147-153.

Tempete, C., Werner, G. H., Favre, F., Rojas, A., Langlois, N., 1995. In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyprothramycin B. *European Journal of Medicinal Chemistry* 30, 647-650.

Venturini, T. P., Rossato, L., Spader, T. B., Tronco-Alves, G. R., Azevedo, M. I., Weiler, C. B., Santurio, J. M., Alves, S. H., 2011. In vitro synergisms obtained by amphotericin b and voriconazole associated with non-antifungal agents against fusarium spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 71, 126-130.

Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R., Barnes, S., 2010. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Medica* 76, 1132-1142.

Wang, D., Xia, M., Cui, Z., 2006a. New triterpenoids isolated from the root bark of *Ulmus pumila* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 54, 775-778.

Wang, R., Wei, W., Wang, L., Liu, R., Yi, D., Du, L., 2006b. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 77, 534-537.

Wen, X., Zhang, P., Liu, J., Zhang, L., Wu, X., Ni, P., Sun, H., 2006. Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 722-726.

WHC, 2005. Properties inscribed on the world heritage list, convention concerning the protection of the world cultural and natural heritage. In: UNESCO (Ed.).

Xin-Min, C., Yoshida, T., Hatano, T., Fukushima, M., Okuda, T., 1987. Galloylarbutin and other polyphenols from *Bergenia purpurascens*. *Phytochemistry* 26, 515-517.

Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M., Sim, K. Y., 1996. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products* 59, 643-645.

Yoshida, T., Seno, K., Takama, Y., Okuda, T., 1982. Bergenin derivatives from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry* 21, 1180-1182.

Resumo

Hoje em dia, a descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças fúngicas torna-se essencial. Algumas árvores da Amazônia desenvolveram ao longo da evolução metabólitos secundários de defesa, para proteger-se contra a degradação. Estas mesmas substâncias vegetais podem tornar-se candidatas potenciais para o desenvolvimento de compostos antifúngicos. Esta tese de doutorado descreve a seleção bio-inspirada e a coleta de espécies da floresta amazônica da Guiana Francesa possuidoras de madeira altamente resistente aos fungos; a partir das quais é proposto isolar, identificar e valorizar os metabólitos secundários responsáveis da durabilidade natural, e estudar as suas propriedades em fungos patogênicos humanos. O estudo levou ao isolamento de substâncias inéditas e forneceu informações adicionais quimiotaxonômicas importantes para as espécies estudadas. No mais, foi possível estabelecer que duas substâncias podem ser relevantes para o desenvolvimento de terapias antimicóticas.

Abstract

It is now essential to discover new therapeutic agents against the increase of human fungal infections. On the other hand, some Amazonian trees have succeeded to develop a chemical defense arsenal to protect themselves against fungal degradation. These compounds of plant origin could become potential candidates for the development of antifungal compounds for the treatment of human fungal diseases. Therefore, this manuscript describes the bio-inspired selection and collection of Amazonian tree species capable of specializing a highly fungi-resistant wood; from which it is proposed to isolate, identify and valorize the secondary metabolites responsible for the natural durability, and study their properties on human pathogenic fungi. Ultimately, this study led to the isolation of new compounds and providing additional important chemotaxonomic information for the species studied. In addition, it has been established that two compounds could be relevant for the development of antimicrobial therapies.